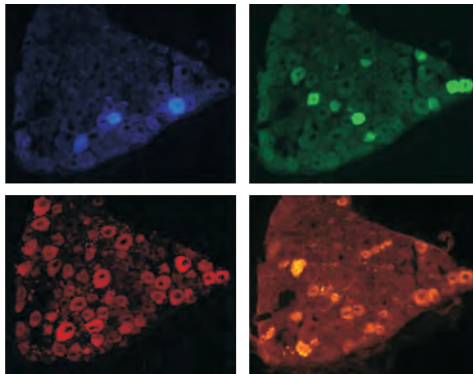


NACHWEIS DER $\alpha 3$ -UNTEREINHEIT DES NIKOTINISCHEN ACETYLCHOLIN-REZEPTORS AUF SPINALEN ATEMWEGSAFFERENZEN

KATJA HANS



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2010

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2010

© 2010 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuerin: Prof. Dr. S. Kölle

und

Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. W. Kummer

**Nachweis der $\alpha 3$ -Untereinheit des nikotinischen
Acetylcholin-Rezeptors auf spinalen
Atemwegsafferenzen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Katja Hans

Tierärztin aus Werne

Gießen 2010

**Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter/in:

Prof. Dr. S. Kölle

Prof. Dr. W. Kummer

Tag der Disputation: 08.07.2010

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	3
2.1 Die autonome und sensorische Innervation der unteren Atemwege und der Lunge	3
2.1.1 Die sympathische Innervation der unteren Atemwege und der Lunge	3
2.1.2 Die parasympathische Innervation der unteren Atemwege und der Lunge	4
2.1.3 Die sensorische Innervation der unteren Atemwege und der Lunge	5
2.2 Spinalganglien	8
2.2.1 Lage und Funktion der Spinalganglien	8
2.2.2 Spinalganglienneurone lassen sich in verschiedene Populationen einteilen	8
2.2.3 Calcitonin gene-related peptid (CGRP) in Spinalganglienneuronen	9
2.2.4 Neurofilament 68 (NF68, NF-light) in Spinalganglienneuronen	10
2.2.4.1 Neurofilamente gehören zur Familie der Intermediärfilamente (IM)	10
2.2.4.2 Neurofilamente	11
2.3 Nikotinische Acetylcholinrezeptoren (nAChR)	12
2.3.1 Lokalisation und Struktur des nAChR	12
2.3.2 Eigenschaften der nAChRs	14
2.3.3 Agonisten, Antagonisten und Liganden des nAChRs	15
2.3.4 Nikotinische Acetylcholinrezeptoren auf sensorischen Atemwegsafferenzen	16
2.4 Retrograde neuronale Markierung	19
3 Material und Methoden	21
3.1 Versuchstiere	21
3.2 Tracerapplikation in die Atemwege	21
3.3 Perfusionsfixierung und Präparation des Gewebes	22
3.4 Anfertigung der Gewebeschnitte	24
3.5 Immunfluoreszenz und Histochemie	24
3.6 Auswertung	26

4 Ergebnisse	27
4.1 Verteilung des Tracers Fast Blue nach trachealer/pulmonaler Applikation	27
4.1.1 Tracerverteilung am Applikationsort	27
4.1.2 Tracerverteilung in applikationsfernen Organen	28
4.1.3 Segmentale Verteilung des Tracers Fast Blue in DRG-Neuronen	29
4.2 Perikaryondurchmesser der retrograd markierten DRG-Neurone zwischen C5-T5	32
4.3 Neurochemische Charakteristika Fast Blue-positiver DRG-Neurone	34
4.3.1 Häufigkeit immunhistochemisch definierter Subpopulationen Fast Blue-markierter DRG-Neurone	34
4.3.2 Perikaryondurchmesser im Zusammenhang mit den verschiedenen Subpopulationen	42
5 Diskussion	46
5.1 Retrograde neuronale Markierung (kritische Betrachtung des Versuchsaufbaus)	46
5.2 Segmentale Verteilung des Tracers Fast Blue in DRG-Neuronen	47
5.3 Perikaryondurchmesser der retrograd markierten DRG-Neurone	49
5.4 Neurochemische Charakteristika Fast Blue-positiver DRG-Neurone	52
5.4.1 Myelinisierte Nervenfasern	52
5.4.1.1 Häufigkeit von NF68 in zur Lunge projizierenden Spinalganglienneuronen	52
5.4.1.2 $\alpha 3$ -/CGRP-/NF68-positive Neurone	53
5.4.1.3 CGRP-/NF68-positive Neurone	53
5.4.2 Unmyelinisierte Nervenfasern (C-Fasern)	54
5.4.2.1 peptiderge C-Fasern	55
5.4.2.1.1 $\alpha 3$ -/CGRP-positive Neurone	55
5.4.2.1.2 CGRP-positive Neurone	57
5.4.2.2 nicht-peptiderge C-Fasern	58
5.4.2.2.1 $\alpha 3$ -/CGRP-/NF68-negative Neurone	58
5.4.3 Die nAChR-Untereinheit $\alpha 3$ in zur Lunge projizierenden Spinalganglienneuronen	59
5.4.4 Häufigkeit von CGRP in zur Lunge projizierenden Spinalganglienneuronen	60
5.5 Schlussfolgerung	61

6 Zusammenfassung	62
7 Literaturverzeichnis	64
Summary	82
Danksagung	84
Erklärung	85

Abkürzungsverzeichnis:

α Bgt = Alpha-Bungarotoxin

ACh = Acetylcholin

AMCA = Aminomethyl-Coumarin-Acetat

ATP = Adenosintriphosphat

BAC = Bacterial artificial chromosome

CGRP = Calcitonin gene-related peptid

COPD = Chronic Obstructive Pulmonary Disease

Cy3 = Carbocyanin3

Cy5 = Indodicarbocyanin

eGFP = enhanced green fluorescent protein

FB = Fast Blue

FITC = Fluoresceinisothiocyanat

GABA = Gamma-Aminobuttersäure

GDNF = glial cell derived neurotrophic factor

GFP = Green fluorescent protein

IB4 = Isolektin B4

IgG = Immunglobulin G

IM = Intermediärfilamente

JNC = Jugular-Nodose Ganglion Complex

mRNA = messenger-RNA

nAChR = Nikotinische Acetylcholinrezeptoren

NaCl = Natriumchlorid

NANC = nonadrenerg-noncholinerg

NEB = neuroepitheliale Körperchen

NF68 = Neurofilament 68

NF-H = Neurofilament heavy

NF-L = Neurofilament light

NF-M = Neurofilament medium

NGF = Nerve Growth Factor

NKA = Neurokinin A

NO = Stickstoffmonoxid

NOS = NO-Synthetase

NPY = Neuropeptid Y

PFA = Paraformaldehyd

PNS = peripheries Nervensystem

PP = Phosphatpuffer

RARs = rapid adapting receptors

RM = Rückenmark

SARs = slowly adapting receptors

SCG = Superiour Cervical Ganglion

SP = Substanz P

TM = Transmembranhelices

TRPA1 = transient receptor potential A1

VIP = vasoaktives intestinales Peptid

VR1 = Vanilloid Rezeptor 1

ZNS = zentrales Nervensystem

1 Einleitung

In den Atemwegen ist Acetylcholin (ACh) einer der stärksten bekannten Bronchokonstriktoren und Sekretionsstimulatoren. Es entfaltet seine Wirkung über G-Proteingekoppelte muskarinische Rezeptoren und über nikotinische Rezeptoren (nAChR), die Ionenkanäle bilden. ACh ist als klassischer Neurotransmitter bekannt, der von parasympathischen Nervenfasern freigesetzt wird, die die glatte Atemwegsmuskulatur und Drüsen innervieren. Neben diesem neuronalen ACh wird in den Atemwegen auch non-neuronales ACh von verschiedenen Epithelzellen, wie den zilientragenden Zellen, Bürsten- und Basalzellen, sowie von Zellen des Immunsystems synthetisiert und freigesetzt (Kummer et al. 2008). Es wird davon ausgegangen, dass non-neuronales ACh entweder direkt an der freisetzenden Zelle (autokriner Effekt) oder an der Nachbarzelle (parakriner Effekt) wirkt (Wessler et al. 1998). ACh fördert z.B. die Freisetzung von Zytokinen und beteiligt sich dadurch an der Proliferation von z.B. Bronchialepithelzellen (Klapproth et al. 1998). Non-neuronales ACh moduliert auch verschiedene Funktionen der Immunabwehr (Wessler et Kirkpatrick 2001). Einerseits beteiligt es sich durch Beeinflussung des Immunsystems an entzündlichen Veränderungen der Atemwege (Barnes et al. 2004), andererseits zeigt es durch die Hemmung der Degranulation von Mastzellen antiinflammatorische Effekte (Reinheimer et al. 1997, Blanchet et al. 2004).

Dennoch sind die Zielstrukturen des epithelialen ACh noch nicht eindeutig identifiziert. Es ist plausibel anzunehmen, dass epitheliales ACh vorzugsweise an Strukturen wirkt, die in enger Nachbarschaft zum Epithel liegen. Neben Zellen des Immunsystems sind insbesondere sensorische Nervenendigungen als Wirkungsort des epithelialen AChs denkbar, da diese häufig direkt unterhalb der Basalmembran liegen oder zwischen den Epithelzellen gefunden werden (Kummer et al. 2008). Gerade für Nikotin, den prototypischen Agonisten an nAChR, sind Effekte auf sensorische Neurone beschrieben worden. Es hat einen direkt stimulierenden Effekt auf pulmonale sensorische Neurone (Lee et al. 1993). Teilweise wird die sensorische respiratorische Antwort auf Nikotin über bronchopulmonale C-Faser Afferenzen vermittelt (Dehkordi et al. 2009). Detaillierte Informationen über die durch Nikotin stimulierbaren Untergruppen der sensorischen Neurone der Atemwege sowie über die beteiligten Subtypen von nAChR liegen nicht vor. Untersuchungen an primär afferenten Neuronen der Spinalganglien, bei denen aus methodischen Gründen eine Zuordnung der sensorischen

Neurone zu einem bestimmten Zielorgan nicht möglich war, zeigten unter den verschiedenen Untereinheiten von nAChR eine besonders konstante Expression und funktionelle Wichtigkeit der Untereinheit $\alpha 3$ (Haberberger et al. 2004, Spies et al. 2006).

Die vorliegende Arbeit hatte daher zum Ziel zu prüfen, ob diese nAChR $\alpha 3$ -Untereinheit von spinalen sensorischen Neuronen der Atemwege und Lunge exprimiert wird, und falls ja, von welchen Subtypen der sensorischen Neurone. Dafür wurden transgene Mäuse verwendet, in denen das grün fluoreszierende Protein eGFP (enhanced green fluorescent protein) unter der Kontrolle der endogenen $\alpha 3$ -nAChR-Untereinheit Promotoraktivität exprimiert wird. Zur Lunge bzw. den Atemwegen projizierende DRG-Neurone wurden mittels retrogradem Tracing identifiziert. Die markierten DRG-Neurone wurden immunhistochemisch mit Antikörpern gegen Marker bestimmter Neuronsubpopulationen charakterisiert und ihre Größe, ein weiteres Maß für die Leitungsgeschwindigkeit, bestimmt.

2 Literaturübersicht

2.1 Die autonome und sensorische Innervation der unteren Atemwege und der Lunge

Die unteren Atemwege beginnen mit dem Kehlkopf und setzen sich über Trachea und Hauptbronchien in die Lunge fort, wo sie sich bis zu den Bronchioli terminales weiter verzweigen. Mit den darauf folgenden Bronchioli respiratorii beginnt die Gasaustauschregion der Lunge. Die Innervation der unteren Atemwege wird klassisch eingeteilt in ein sympathisches, parasympathisches und sensorisches System. Der sympathische und der parasympathische Anteil werden zusammengefasst als autonomes efferentes System. Um die Atemwege herum verzweigen sich die sensorischen, sympathischen und parasympathischen Fasern zu einem Nervenplexus, das an der Hinterwand der Trachea liegt und am Lungenhilus in die Lunge eintritt.

2.1.1 Die sympathische Innervation der unteren Atemwege und der Lunge

In der intermediären Zone des Brustmarks liegen die präganglionären sympathischen Neurone. Die sympathischen präganglionären Fasern verlassen von dort aus zusammen mit motorischen Fasern über die Vorderwurzel das Rückenmark und ziehen zu den zervikalen und thorakalen Grenzstrangganglien, wo sie mit postganglionären Neuronen verschaltet sind (Kummer et al. 1992). Neben Acetylcholin (Lindh et al. 1986) ist auch Stickstoffmonoxid (NO) (Blottner et al. 1992) als Transmitter der präganglionären Neurone zu nennen.

Postganglionäre Fasern, die die Atemwege innervieren und zusammen mit den Rr. pulmonales zur Lunge ziehen, haben ihren Ursprung im Ganglion cervicale superius, medius und Ganglion stellatum, sowie die Lunge betreffend in den thorakalen Grenzstrangganglien T2-T4 (Kummer et al. 1992). Allerdings weist die sympathische Atemwegsinnervation erhebliche Speziesunterschiede auf. Die Innervation ist beim Menschen relativ gering ausgebildet (Doidge et Satchall 1982, Sheppard et al. 1983, Smith et Satchell 1985), während sie beim Meerschweinchen durch ein dichtes Geflecht von sympathischen noradrenergen Nervenfasern gekennzeichnet ist (Coburn et al. 1973). Die sympathischen Fasern enden in der glatten Atemwegsmuskulatur; sie führen über Stimulation der β -Rezeptoren zu einer Bronchodilatation. Der klassische postganglionäre Überträgerstoff ist Noradrenalin. Als Mediatoren kommen daneben aber auch Stickstoffmonoxid (NO), vasoaktives intestinales

Peptid (VIP) und Neuropeptid Y (NPY) vor (Maggi et al. 1995). Um die tracheobronchialen und pulmonalen Gefäße konnten bei verschiedenen Spezies, wie Maus, Ratte, Meerschweinchen, Affe und Mensch, sympathische Nervenfasern nachgewiesen werden (Mann, 1971, Doidge und Satchell, 1982). Der Sympathikus bewirkt eine Vasokonstriktion und trägt zum Ruhetonus der Lungengefäße bei (Zschuer et al., 1997).

2.1.2 Die parasympathische Innervation der unteren Atemwege und der Lunge

Die parasympathischen Nervenfasern der Atemwege steuern Bronchokonstriktion und Schleimsekretion. Die präganglionären parasympathischen Neurone liegen im Nucleus ambiguus und Nucleus dorsalis nervi vagi. Zum Teil ziehen die Fasern dieser Neurone über die vagalen Rami bronchiales, die in der Höhe des Lungenhilums aus dem Nervus vagus entspringen (Hollenberg 1986), zu den postganglionären Neuronen. Mit dem Nervus laryngeus recurrens ziehen ebenfalls Fasern dieser präganglionären Neurone zu den kleinen intramuralen Ganglien der Trachea.

Acetylcholin (ACh) ist der klassische Mediator der prä- und postganglionären parasympathischen Neurone. Durch den Nachweis von Acetylcholinesterase, dem ACh-Abbauenzym, konnte ACh als Mediator in postganglionären parasympathischen Neuronen, die mit ihren Nervenendigungen die glatte Atemwegsmuskulatur und die exokrinen Drüsen innervieren, nachgewiesen werden (Mann 1971). Die postganglionären Neurone enthalten außerdem weitere Mediatoren wie VIP und NO, welche unterschiedliche und teilweise entgegengesetzte pharmakologische Wirkungen besitzen (Fischer et al. 1996). Canning et al. zeigten 1998, dass eine separate Gruppe von parasympathischen Neuronen eine nonadrenerge-noncholinerge (NANC) Bronchuserweiterung beim Meerschweinchen vermittelt (Canning et al. 1998). Sie zeigten, dass diese Neurone vom Oesophagus des Meerschweinchens zur Trachea projizieren und dort zur Bronchodilatation führen und Immunreaktivität für VIP oder NOS (NO-Synthase) aufweisen. Die Neurone hingegen, die cholinerge Kontraktionen (Bronchokonstriktion) vermitteln, stehen in keiner Weise mit dem Oesophagus in Verbindung. Auch die glatte Muskulatur der Trachea, Bronchi und Bronchioli (Partanen et al. 1982), die großen Pulmonalgefäße sowie die Drüsen und die sekretorischen Zellen des Epithels werden von parasympathischen Fasern versorgt (Mann 1971).

2.1.3 Die sensorische Innervation der unteren Atemwege und der Lunge

Afferente (=sensorische) Nervenfasern der Atemwege ziehen zum größten Teil mit den präganglionären parasympathischen Nervenfasern im Nervus vagus zum Nucleus tractus solitarius und zum Atemzentrum im Bereich der ventrolateralen Medulla. Die Zellkörper dieser pseudounipolaren Neurone liegen im Ganglion jugulare und Ganglion nodosum (Kummer et al. 1992). Ein geringer Teil der sensorischen Nervenfasern zieht von den Atemwegen mit sympathischen Nervenfasern zum Rückenmark, dabei durchqueren sie die sympathischen Grenzstrangganglien (Saria et al. 1985, Kummer und Oberst 1993) und ziehen über die Hinterwurzel zur Substantia gelatinosa (Laminae I und II) im Hinterhorn des Rückenmarks. Die Perikaryen dieser zusätzlichen afferenten Atemwegsversorgung finden sich in den thorakalen Spinalganglien (Lundberg et al. 1988, Kummer et al. 1992).

An der neuronalen Regulation der Atmung sind die viszerale Afferenzen beteiligt. Sie melden die Reize von Mechano-, Chemo- und Nozizeptoren. Die sensorischen Nervenfasern können sowohl durch exogene Stimuli wie Capsaicin als auch durch endogene Stimuli wie Histamin, Bradykinin und Prostaglandinen aktiviert werden (Saria et al. 1988). Die sensorischen Nervenfasern, die die Atemwege innervieren, lassen sich nach morphologischen und physiologischen Gesichtspunkten in myelinisierte A-Fasern und in unmyelinisierte C-Fasern einteilen (Coleridge und Coleridge 1994).

Aufgrund elektrophysiologischer Eigenschaften lassen sie sich in vier Klassen mit verschiedenen Rezeptortypen einordnen:

1. **SARs** (slowly adapting receptors) sind langsam adaptierende Dehnungsrezeptoren, die hauptsächlich in der glatten Muskulatur der Trachea und des Bronchus zu finden sind und myelinisierte A α - und A β -Fasern aufweisen (Guz und Treuchard 1971). Sie reagieren auf Veränderung der Wandspannung und schützen die Lunge vor Überdehnung durch Auslösung des Hering-Breuer-Reflexes. Außerdem sind sie für die Regulierung und Kontrolle der physiologischen Atmung zuständig und haben damit Einfluss auf die Atemmechanik und den Bronchialmuskeltonus (Widdicombe und Wells 1994). Die Nervenfasern erreichen durch ihre Myelinisierung relativ hohe Leitungsgeschwindigkeiten (5,8 m/s) (Hersch et al. 1986).
2. **RARs** (rapid adapting receptors) sind schnell adaptierende Dehnungsrezeptoren (15 m/s) (Canning 2006). Bei Hund und Katze sind sie vom Nasopharynx bis in die terminalen Bronchien weit verbreitet (Guz und Treuchard 1971). Sie befinden sich im respiratorischen Epithel sowie in der glatten Atemwegsmuskulatur und ihre Axone sind

myelinisiert. Ihre Sensitivität und Reflexantwort kann sich je nach Lage unterscheiden. Sie reagieren auf mechanische und chemische Stimuli, aber auch auf immunologische und inflammatorische Mediatoren (Sant`Ambrogio und Widdicombe, 2001). In den proximalen großen Bronchien und in der Trachea sind die RARs mechanosensitiv, dagegen sind sie in den distalen Bronchien eher chemosensitiv (Widdicombe 2003). Die chemische Reizung führt zu verstärkter Atmung (Hyperventilation) (Widdicombe 2001).

3. **Cough receptors**

Der Hustenreflex wird nicht, wie lange Zeit vermutet, über C-Fasern oder RARs, sondern über Cough receptors vermittelt. Es handelt sich um vagale sensorische Nervenfasern, die ihren Ursprung im Ggl. nodosum haben und auf mechanische Stimuli reagieren. Ihre Axone sind anders als bei den C-Fasern myelinisiert und sie zeigen sich gegen Capsaicin unempfindlich. Die Endigung dieser Fasern befinden sich in der Schleimhaut der laryngealen, trachealen und bronchialen Atemwege und sind anders als die RARs nicht intrapulmonal zu finden. Weitere Unterschiede zeigen sich in der Unempfindlichkeit der Cough receptors gegenüber einer Vielfalt spasmogen wirkender Substanzen und Autacoiden wie Histamin, Substanz P, Neurokinin A und ATP (Adenosintriphosphat), die zu Kontraktionen der glatten Atemwegsmuskulatur führen. Auch ihre Leitungsgeschwindigkeit unterscheidet sich mit 5 m/s von den deutlich schnelleren RARs (Canning 2006).

4. **C-Fasern** sind alle sensorischen Fasern, die im Gegensatz zu Dehnungs-, Husten- und Irritanzienrezeptoren nicht myelinisiert sind. Aufgrund ihrer unmyelinisierten Axone leiten sie sehr langsam (<1 m/s) (Coleridge und Coleridge 1984). Sie nehmen potenziell gewebeschädigende Reize wahr. Der Gefäßversorgung entsprechend kann man die C-Fasern in eine bronchiale und eine pulmonale Population gliedern (Widdicombe und Wells 1994). Pulmonale C-Fasern enden in den Alveolarwänden im Lungenparenchym. Volumenzunahme in der Lunge stimuliert die C-Fasern und führt zu Bradykardie, Hypotension und Apnoe, gefolgt von flacher, frequenter Atmung (Coleridge und Coleridge 1994, Widdicombe und Wells 1994). Im Gegensatz dazu enden die bronchialen C-Fasern in der Mukosa der Atemwege. Die Reaktionen sind denen der pulmonalen C-Fasern allerdings ähnlich. Außerdem lösen sie Bronchokonstriktion und erhöhte Schleimproduktion aus.

Riccio et al. zeigten durch retrograde Tracingversuche und elektrophysiologische Untersuchungen, dass sich C-Fasern und RARs nicht nur elektrophysiologisch, sondern auch neuroanatomisch voneinander unterscheiden. Außerdem fanden sie eine räumliche Trennung

von RARs und SARs. Während die SARs ihren Ursprung im Ganglion jugulare haben, ist der Ursprung der capsaicinunempfindlichen RARs im Ganglion nodosum zu finden. Die Perikaryen der C-Fasern befinden sich im Ganglion jugulare und zeigen sich capsaicinempfindlich (Ricco et al. 1996).

Im Gegensatz zu den Cough receptors können C-Fasern neben der Informationsübermittlung auch direkt nach einer Stimulation pro-inflammatorische Neuropeptide wie Tachykinine freisetzen. Die Neuropeptide Substanz P (SP) und Neurokinin A (NKA) gehören zur Tachykinfamilie und haben in den Atemwegen pro-inflammatorische Wirkung (Stretton 1991, Hsiue et al. 1992). Calcitonin gene-related peptid (CGRP) ist ein sehr häufig in den sensorischen Neuronen der Atemwege vorkommendes Neuropeptid. Es wird von denselben Neuronen produziert, die auch SP und NKA produzieren. CGRP scheint bei der Vermittlung der Vasodilatation das wichtigste Neuropeptid zu sein (Martling et al. 1988). Durch die Freisetzung der Neuropeptide kann es zu einer neurogenen Entzündung mit Bronchokonstriktion, Schleimhautschwellung und vermehrter Schleimsekretion kommen (Nadel 1990).

2.2 Spinalganglien

2.2.1 Lage und Funktion der Spinalganglien

Das Spinalganglion (Ggl. spinale) wird auch Hinterwurzelganglion, bzw. im Englischen dorsal root ganglion (DRG) genannt.

Die Anzahl der Spinalnerven und somit der Spinalganglien ist an die Anzahl der Wirbel gebunden. Im Halsbereich zieht der erste Zervikalnerv durch das Foramen vertebrale laterale des Atlas. Die folgenden sechs treten vor dem gleichzähligen Wirbel aus. Der letzte Halsnerv tritt zwischen dem letzten Hals- und dem ersten Brustwirbel hervor, so dass es je Körperhälfte acht Halsnerven (dementsprechend auch acht zervikale Spinalganglien) bei nur sieben Halswirbeln gibt (König-Liebich 2002).

Jeder Spinalnerv entspringt mit einer aus einer wechselnden Anzahl von Faserbündeln bestehenden dorsalen (Radix dorsalis) und einer ventralen Wurzel (Radix ventralis) aus dem Rückenmark. Jeder Dorsalwurzel ist ein DRG eingelagert, dessen Größe abhängig von der Anzahl der eingelagerten afferenten Nervenzellkörper ist (Nickel 1992).

Die DRGs sind Sitz der Zellkörper der sensiblen Wurzelzellen der zuführenden Nervenfasern zum Rückenmark. Die Fortsätze der DRG-Neurone entspringen T-förmig aus dem Soma; die Neurone werden daher als pseudounipolar bezeichnet. Ein axonaler Fortsatz zieht im peripheren Nerven in die Körperperipherie, der andere zieht über die Dorsalwurzel in das Rückenmark (Leonhard 1990). Über diese afferenten Neurone werden Sinnesreize erfasst und verarbeitet.

2.2.2 Spinalganglienneurone lassen sich in verschiedene Populationen einteilen

Nervenfasern lassen sich aufgrund ihrer Nervenleitungsgeschwindigkeit in A-, B- und C-Fasern einteilen (Gasser und Erlanger 1944). Die A-Fasern lassen sich noch weiter in A α , A β , A γ und A δ unterteilen (Gasser 1945, Klink 2001). DRG-Neurone besitzen ausschließlich somato- und viszerosensible A α -, A β -, A δ - und C-Fasern. Die am häufigsten vorkommenden nozizeptiven Neurone sind solche mit C-Fasern, gefolgt von A δ -Fasern. Weniger häufig kommen solche mit A α / β -Fasern vor (Lawson 2002).

Anhand der Größe des Perikaryondurchmessers lassen sich Aussagen über die Leitungsgeschwindigkeit treffen. Bei den kleinen Perikaryondurchmessern handelt es sich um Neurone der langsam leitenden C-Fasern mit unmyelinisierten Axonen oder um A δ -Fasern mit dünn myelinisierten Axonen. Sie zählen zu den polymodalen Nozizeptoren, Chemonozizeptoren und Thermozeptoren (Michael und Priestley 1999, Lawson 2002).

Bei den mittelgroßen und großen Perikaryendurchmessern handelt es sich um schnell leitende A α - und A β -Fasern mit stärker myelinisierten Axonen. Es handelt sich v.a. um Muskel- und Hautafferenzen, welche auf niederschwellige Stimuli ansprechen (Mc Mahon 1999, Lawson 2002).

2.2.3 Calcitonin gene-related peptid (CGRP) in Spinalganglienneuronen

CGRP ist ein aus 37 Aminosäuren bestehendes Peptid, das durch den Einfluss von Nervenwachstumsfaktor (Nerve growth factor, NGF) von den Nervenzellen selbst synthetisiert wird (Bennett et al. 1996, Ogun-Muyiwa et al. 1999). Calcitonin und CGRP werden von demselben Gen codiert. Durch alternatives Spleißen entsteht entweder Calcitonin oder im Nervengewebe α -CGRP (Amara et al. 1985, Steenbergh et al. 1984 und 1985, Wimalawansa, 1990). Es gibt zwei verschiedene CGRP Formen, welche sich je nach Spezies zwischen 1 und 3 Aminosäuren voneinander unterscheiden. Das zuerst entdeckte und gemeinsam mit Calcitonin von einem Gen kodierte wird α -CGRP genannt. Ein weiteres Gen kodiert nur für β -CGRP. Hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität weisen beide CGRP Formen keine bisher bekannten Unterschiede auf (Noguchi et al. 1990).

Im ZNS sowie im PNS ist CGRP weit verbreitet. Besonders häufig findet sich CGRP in den Nervenzellkörpern des Ganglion trigeminale, von denen C- und A δ -Fasern entspringen, sowie in den Hirnnervenkernen (van Rossum et al. 1997, Gibson et al. 1984, Levine et al. 1993, Unger et al. 1991). Ungefähr 40% der Spinalganglienneurone exprimieren CGRP. Ihre Axone projizieren in die Laminae I und II des Hinterhorns des Rückenmarks (Coprav et al. 2001, Lu et al. 2003).

Die kleinen Spinalganglienneurone, die einen geringen Gehalt an Neurofilament (NF) besitzen, sind vor allem für die Schmerzempfindung und Schmerzweiterleitung verantwortlich. Sie können wiederum unterteilt werden in Zellen, die CGRP enthalten, und Zellen, die Bindungsstellen für Isolectin B4 aufweisen (Chopra et al. 2000, Ahluwalia et al. 2002). CGRP wird entlang des Axons in die Peripherie transportiert. Kommt es zu einem schädigenden Reiz, spielt es dort eine Rolle bei neurogenen Entzündungen, denn CGRP ist ein starker Vasodilatator und wirkt außerdem auf immunkompetente Zellen wie dendritische Zellen (Carucci et al. 2000). Eine Aktivierung der CGRP-Rezeptoren durch CGRP führt im Hinterhorn des Rückenmarks zu einer Veränderung der Transmitterfreisetzung und dazu, dass die Erregungsschwelle bei diesen Neuronen herabgesetzt wird. Die Entwicklung einer

spinalen Übererregbarkeit gegenüber inflammatorischen Reizen wird hierdurch gefördert (Hu-Tsai et al. 1996, Ohtori et al. 2001, Segond von Blanchet et al. 2002).

Zwei unterschiedliche Subpopulationen primär afferenter nozizeptiver Neurone befinden sich im Spinalganglion. Sie unterscheiden sich in ihren biochemischen und elektrophysiologischen Eigenschaften, aber auch in den anatomischen Regionen der Endigungen ihrer Axone. Sie haben somit unterschiedliche Funktionen im schmerzverarbeitenden System (Stucky und Lewin 1999). Die CGRP-positiven Neurone spielen bei inflammatorischen Reaktionen eine größere Rolle, während die IB4-bindenden Neurone scheinbar mehr bei der Entstehung des neuropathischen Schmerz beteiligt sind (Ogun-Muyiwa et al. 1999; Li und Zhou 2001).

Eine solche strikte Trennung in peptiderge und nicht-peptiderge nozizeptive Neurone ist allerdings nicht ganz korrekt; es konnten bereits mehr Untergruppen klassifiziert werden, u.a. Spinalganglienneurone, die sowohl IB4-Bindungsstellen exprimieren als auch gleichzeitig CGRP produzieren können (Petruska et al. 2000; Kashiba et al. 2001; Petruska et al. 2002).

2.2.4 Neurofilament 68 (NF68, NF-light) in Spinalganglienneuronen

2.2.4.1 Neurofilamente gehören zur Familie der Intermediärfilamente (IM)

Neurofilamente (NF) gehören zur Familie der Intermediärfilamente (IM). IM bilden zusammen mit Mikrofilamenten und Mikrotubuli das Zytoskelett der Zelle. Sie haben einen Durchmesser von 8 bis 10 nm und liegen somit zwischen dem von Aktin (~ 7-9 nm) und dem der Mikrotubuli (~ 20 nm), dieser Umstand verleiht den IM ihren Namen, intermediate = dazwischenliegend (Ishikawa et al. 1968). Ihre Länge beträgt mehrere μm . Sie haben eine α -helikale Struktur. Diese besteht aus drei umeinander gewundenen Polypeptidketten, die sich zu einem Faden zusammenlagern. Drei bis vier dieser Fäden bilden zusammen ein IM, was sie besonders stabil macht. Die IM bilden ein Netzwerk um den Zellkern, das bis zu den Desmosomen und der Zellmembran reicht. Dieses interzelluläre Netzwerk stabilisiert die Zelle. Die gemeinsame, zentrale, stäbchenartige Domäne besteht aus zwei α -helikalen Untereinheiten („coiled-coil“). Diese zentrale Einheit wird von einem nicht- α -helikalen aminoterminalen „Kopf“ und einem carboxyterminalen „Schwanz“ flankiert (Parry und Steinert 1995).

Die IM bestehen aus einer Gruppe strukturell unterschiedlicher, eng verwandter Proteine, die sich auf Grund von Sequenzhomologien in den Zentraldomänen in verschiedene Klassen einteilen lassen (Drenckhahn 1994):

Klasse I: saure Keratine

Klasse II: neutrale und basische Keratine

Klasse III: Vimentin, GFAP (glial fibrillary acidic protein), Desmin und Peripherin

Klasse IV: Neurofilamente NF-L, NF-M und NF-H und α -Internexin

Klasse V: Lamine

Klasse VI: Nestin (Lendahl et al. 1990)

Die Aufstellung der Klasse VI ist umstritten, einige Autoren folgen ihr nicht (Herrmann et al. 2000).

2.2.4.2 Neurofilamente

Neurofilamente werden ausschließlich in Neuronen exprimiert und kommen sowohl im ZNS als auch im PNS vor (Yan et al. 2007). NF sind wichtige Elemente des neuronalen Zytoskeletts. Sie werden in den Perikarya der Neurone synthetisiert und anschließend via axonalem Transport nach distal (Axon) befördert. In den großen myelinisierten Axonen der motorischen und sensorischen Neuronen sind sie häufig zu finden und stellen, wie auch andere IM, sehr dynamische Strukturen dar (Monteiro und Cleveland 1989, Ching und Liem 1993). Ein Neurofilamentproteinkomplex setzt sich aus den drei Proteinen NF-L (light), NF-M (medium) und NF-H (heavy) zusammen, die sich in ihrem Molekulargewicht unterscheiden (68, 160 und 200 kD) (Hoffman und Lasek, 1975). Neurofilament-Intermediärfilamente sind aus den drei Proteinen NF-H, NF-M und NF-L im Verhältnis 1:2:6 zusammengesetzt und an Serin-Resten extensiv phosphoryliert (Lewis et al., 1985, Hisanaga et al. 1990).

Bei den NF handelt es sich um obligatorische Heteropolymere, die untereinander in der Lage sind, einzelne Untereinheiten auszutauschen (Okabe et al. 1993). Jede Untereinheit stellt ein eigenständiges Proteinmolekül dar. Als Bestandteil des Zytoskeletts sorgen sie dafür, die Zellform, die Zell- und Organellen-Motilität sowie die strukturelle Integrität zu erhalten. Die Kontrolle des axonalen Durchmessers ist die Hauptaufgabe der Neurofilamente, was von besonderer Wichtigkeit ist, denn die Leitungsgeschwindigkeit eines Impulses entlang des

Axons ist proportional zum Axondurchmesser. In Neuronen mit großem axonalen Durchmesser ($> 5\mu\text{m}$) sind Neurofilamente besonders häufig zu finden (Ohara et al. 1993, Sakaguchi et al. 1993, Zhao et al. 1994).

Experimente mit Mäusen, deren phänotypisches Merkmal ein Mangel an axonalen NF (insbesondere NF-L) ist, geben Hinweise darauf, dass NF an der Determination des Axondurchmessers beteiligt sind. Eine Senkung der Nervenleitgeschwindigkeit um bis zu 50% und eine deutliche Atrophie der Axone konnte nachgewiesen werden. Die Veränderungen standen im direkten Zusammenhang mit dem Schweregrad des NF-Mangels in den Zellen (Zhu et al., 1997).

Bei Tieren, denen NF-L fehlt, oder nur in geringen Mengen zur Verfügung steht, kann das Regenerationsverhalten der Axone stark vermindert und verzögert sein (Zhu et al., 1997).

2.3 Nikotinische Acetylcholinrezeptoren (nAChR)

2.3.1 Lokalisation und Struktur der nAChR

Die nAChR gehören zur Familie der Cys-loop Rezeptoren, einer Gen-Superfamilie homologer Rezeptoren. Neben nAChR gehören dazu außerdem GABA_A-, Glycin- und die 5-Hydroxy-Tryptamin-3-Rezeptoren (Hucho und Weise 2001). Die Rezeptoren dieser Familie bestehen aus Untereinheiten, die sich zu Pentameren zusammenschließen und so eine Pore bilden. Die nAChR kommen bei Vertebraten an der neuromuskulären Endplatte (muskulärer nAChR), auf Neuronen des ZNS und PNS (neuronaler nAChR) sowie auch außerhalb des Nervensystems und der Muskulatur vor. Es handelt sich um ligandengesteuerte Ionenkanäle, die aus fünf membrandurchspannenden Untereinheiten bestehen. Anand et al. konnten dies 1991 bei biochemischen Untersuchungen an nAChR des Huhnes, Galzi und Changeux 1995 bei Untersuchungen an nAChR des Zitterrochens feststellen (Anand et al. 1991, Galzi et Changeux 1995). Jede der fünf Untereinheiten setzt sich zusammen aus einer großen N-terminalen, extrazellulären, hydrophilen Domäne, 4 hydrophoben Transmembranhelices (TM1-TM4) und einer cytoplasmatischen Domäne, welche die TM3- und TM4-Helix verbindet. Die Transmembranhelices TM2 der fünf Untereinheiten bilden die Pore des Rezeptors (Abb. 1). Der muskuläre nAChR ist ausschließlich an postsynaptischen Membranen zu finden, während im Gehirn auch prä-, peri- und extrasynaptische nAChRs exprimiert werden (Lindstrom 1997). Der muskuläre nAChR kann aus den Untereinheiten $\alpha 1$, $\beta 1$, γ , δ und ϵ bestehen. Neuronale nACh-Rezeptoren setzen sich aus α -Untereinheiten

(Homopentamere) oder aus α - und β -Untereinheiten (Heteropentamere) zusammen (Lindstrom 1996, LeNovere et al. 2002). Sie können aus den α -Untereinheiten $\alpha 2$ -7, 9 und 10 sowie den β -Untereinheiten $\beta 2$ -4 zusammengesetzt sein (Lindstrom 1996, Verbitsky et al. 2000). Die α -Untereinheiten heteromerer Rezeptoren können aus zwei verschiedenen Isoformen bestehen. Die beiden Bindungsstellen für ACh heteromerer nAChRs liegen jeweils an der Grenzfläche zwischen den α - und der β -Untereinheiten. Homopentamere weisen fünf Bindungsstellen für ACh an den Grenzflächen zwischen den α -Untereinheiten auf (siehe Abb.1). Da nur die α -Untereinheiten Bindungsstellen für ACh besitzen, muss jeder nAChR mindestens zwei von ihnen haben, um überhaupt zur Signalübertragung fähig zu sein (Edelstein und Changeux 1998, Corringer et al. 2000).

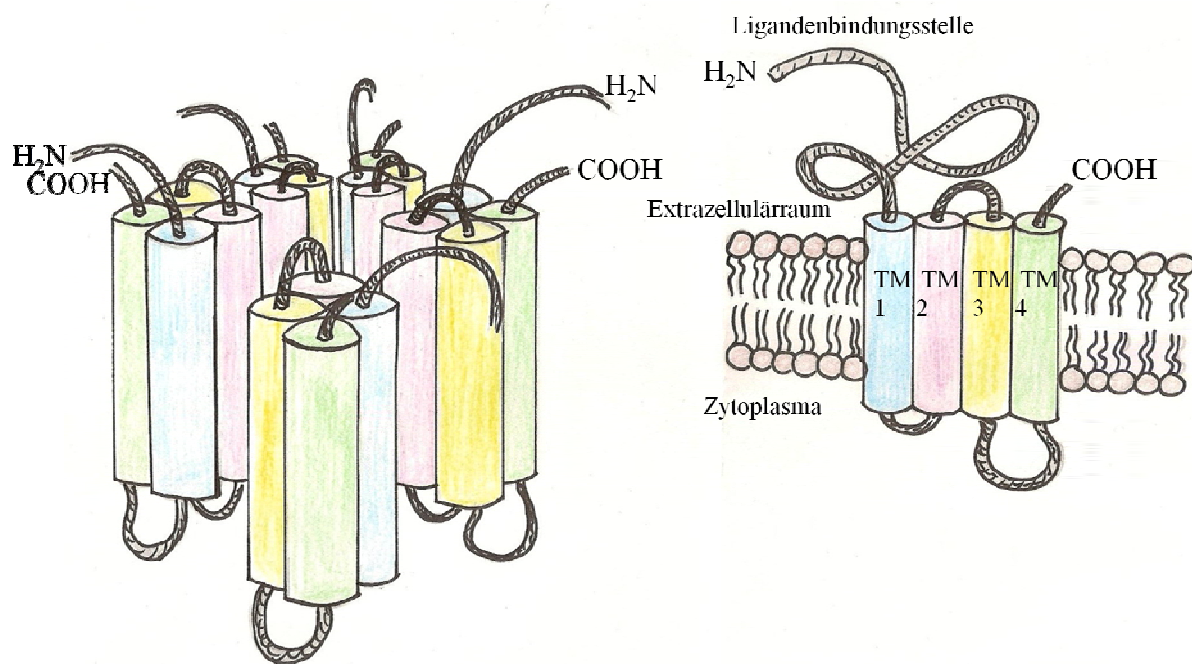


Abb. 1: Struktur der nikotinischen Acetylcholinrezeptoren. Jede der fünf Untereinheiten setzt sich zusammen aus einer großen N-terminalen extrazellulären, hydrophilen Domäne, 4 hydrophoben Transmembranhelices (TM1-TM4) und einer zytoplasmatischen Domäne, welche die TM3- und TM4-Helix verbindet. Die Transmembranhelices TM2 der fünf Untereinheiten bilden die Pore des Rezeptors.

Die neuronalen nAChRs können noch weiter in α -Bungarotoxin (α Bgt)-bindende und nicht- α Bgt-bindende nAChRs unterteilt werden. α Bgt ist ein Schlangengift der Giftnatter (*Bungarus mulicinctus*) und wirkt als kompetitiver Antagonist. Die Untereinheiten α 7, 8, 9 und 10 bilden die α Bgt-bindenden AChRs (Lindstrom 1995). Die nicht- α Bgt-bindenden nAChRs bestehen aus den Untereinheiten α 2, 3, 4, 5 und 6 sowie den β -Untereinheiten 2, 3 und 4 (Sargent 1993). Muskuläre nAChRs bilden Heteropentamere. Auch neuronale nAChRs existieren meistens als Heteropentamere, allerdings kommen auch Homopentamere vor (Leonard und Bertrand 2001). 12 Untereinheiten (α 2- α 10 und β 2- β 4) der neuronalen nAChRs sind bisher bekannt, im Folgenden einige Beispiele zum unterschiedlichen Vorkommen der Untereinheiten: Neuronale nAChR sind in vielen Teilen des ZNS verbreitet, am häufigsten kommt hier der α 4 β 2-nAChR zusammen mit dem α 7-nAChR vor (Duvoisin et al. 1989, Wada et al. 1989, Saguela et al. 1993). Die α 8-Untereinheit wurde bisher lediglich im ZNS von Vögeln gefunden (Gerzanich et al. 1994), während α 9/ α 10-nAChR für die Haarzellen des Innenohrs typisch sind (Elgoyhen 2001). Der α 3 β 4-nAChR ist der im PNS am häufigsten exprimierte Rezeptor (Counturier et al. 1990, Deneris et al. 1991).

2.3.2 Eigenschaften der nAChR

In Folge eines Aktionspotenzials wird ACh aus dem präsynaptischen Neuron in den synaptischen Spalt ausgeschüttet, diffundiert durch diesen und bindet am nAChR. Durch die Bindung kommt es zu einer Konformationsänderung, die die Öffnung des Kanals bewirkt (Adams et al. 1975, Lester et al. 1975). Kationen, z.B. Kalzium und Natrium, strömen in die Zielzelle und führen zu einer Depolarisation. Homopentamere sind vor allem permeabel für Kalzium, weniger für Natrium (Dajas-Bailador et al. 2002). Heteropentamere mit α 3-Untereinheit sind hingegen besonders für monovalente Ionen wie Natrium und Kalium durchlässig (Lukas et al. 1999, Miller 2003). Neuronale nAChR sind im Vergleich zu muskulären nAChR stärker permeabel für Kalzium-Ionen, ihr durchschnittlicher Kalziumanteil am Gesamtstrom ist 4%, während der muskulärer nAChR lediglich 2% erreicht (Mulle et al. 1992, Vernino et al. 1994). Neben der Änderung des Membranpotenzials führt der Kalziumeinstrom auch zur Beeinflussung des Zellstoffwechsels, zur Transmitterfreisetzung und zur Genexpression (Gueorguiev et al. 1999). Natrium führt bei Einstrom durch den nAChR zur Depolarisation der Zellmembran, was spannungsabhängige Kalzium-Kanäle aktiviert und somit zu Kalziumeinstrom führt. Die Erhöhung des Kalziumgehaltes in der Zelle kann den Effekt eines primären Kalziumeinstroms verstärken

(Rathouz und Berg 1994, Dajas-Bailador et al 2002). Während die α -Untereinheiten die Bindungsstellen für ACh ausbilden, besteht die Aufgabe der β -Untereinheiten in der Regulation der Bindung des Liganden an den Rezeptor und seiner Dissoziation vom Rezeptor (Lind et al. 2001, Lenovere et al. 2002).

2.3.3 Agonisten, Antagonisten und Liganden des nAChR

Neuronale nAChRs sind allosterisch regulierte Moleküle. Sie sind in der Lage, eine Reihe unterschiedlicher Substanzen zu binden, die je nach Wirkung als Agonisten, Antagonisten oder als allosterische Liganden mit aktivierendem oder inhibierendem Einfluss bezeichnet werden.

Agonisten binden an die gleiche Stelle wie ACh und lösen so die gleiche Antwort aus, die auch ACh hervorgerufen hätte, ihr bekanntester Vertreter ist Nikotin. Antagonisten blockieren den Rezeptor, sie werden unterschieden in kompetitive und nicht-kompetitive Inhibitoren. Die kompetitiven Antagonisten binden mit vergleichbarer Affinität wie ACh an die Bindungsstelle und konkurrieren so mit den Agonisten um die gleiche Bindungsstelle. Das Schlangengift α -Bgt der Giftnatter ist ein Vertreter dieser Gruppe. α -Bgt wirkt bei muskulären nAChRs sowie bei den homopentameren neuronalen nAChRs $\alpha 7$, $\alpha 9$ und den heteropentameren $\alpha 9/\alpha 10$ (Schoepfer et al. 1990). Auf andere heteropentamere neuronale nAChRs wirkt es jedoch gar nicht oder nur in sehr hoher Konzentration blockierend (Heinemann et al. 1986). Nicht-kompetitive Inhibitoren binden oft in der Kanalpore und blockieren so sterisch den Ionenfluss (Kao et al. 1984). Die allosterischen Liganden mit aktivierendem Einfluss wie z.B. die Acetylcholinesterase-Inhibitoren (z.B. Physostigmin) binden im N-terminalen Bereich der α -Untereinheit an den nAChR. Sie erleichtern die ACh-Bindung und erhöhen so den Agonisten-induzierten Ionenstrom (Pereira et al. 1993, Storch et al. 1995). Allosterische Liganden mit inhibierendem Einfluss auf den nAChR dringen wie z.B. im Falle der Lokalanästhetika in den aktivierten nAChR-Kanal ein und treten mit Aminosäuren in der TM2-Region in Kontakt (Neher und Steiner 1978, Hucho 1986). Sie führen so zu einer sterischen Blockade des nAChR-Kanals. Auch im Grenzbereich zwischen Rezeptorprotein und Lipidmembran besteht die Möglichkeit der Anlagerung nicht-kompetitiver Antagonisten wie Steroide und Arachidonsäure. Sie lagern sich an dieser Stelle an und inaktivieren den nAChR (Quick 1987).

2.3.4 Nikotinische Acetylcholinrezeptoren auf sensorischen Atemwegsafferenzen

Bisher wurde das Vorkommen von nAChR auf sensorischen Atemwegsafferenzen nur wenig erforscht. Bereits 1991 zeigten Boyd et al., dass $\alpha 3$ -nAChR-Untereinheiten von DRG-Neuronen aus Hühnerembryonen exprimiert werden können. Sie fanden in 19% der DRG-Neurone nAChR-mRNA der Untereinheit $\alpha 3$ und in 8% mRNA der Untereinheit $\alpha 4$ (Boyd et al. 1991). RT-PCR-Studien bestätigten die Expression von multiplen nAChR der Untereinheiten $\alpha 2$ - $\alpha 7$ und $\beta 2$ - $\beta 4$ in DRG-Neuronen (Haberberger et al. 2004, Genzen et al. 2007). Dehkordi et al. testeten die nAChR-Expression an intrapulmonalen sensorischen Nervenendigungen und die Kolokalisation mit Substanz P mittels immunhistochemischer Doppelmarkierung von Substanz P-immunreaktiven C-Fasern und verschiedenen nAChR-Untereinheiten. Sie fanden die nAChR-Untereinheiten $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 7$ und $\beta 2$ in allen intrapulmonalen Atemwegsbereichen wie den Bronchi, Bronchiolen, Alveolärwänden, aber auch in den Alveolarmakrophagen. Keine der nAChR-Untereinheiten wurde von Substanz P-immunreaktiven C-Fasern exprimiert, sie lagen aber in enger Nachbarschaft zu nAChR-exprimierenden Epithelzellen der Atemwege. Möglicherweise werden diese C-Fasern durch endogene chemische Substanzen aus nAChR-exprimierenden Epithelzellen stimuliert. Neben dem neuronalen ACh gibt es auch eine große Anzahl non-neuronaler Zellen, die ACh synthetisieren. In den Epithelzellen der Atemwege - neuroendokrine Zellen, Bürstenzellen, aber auch in Cilien- und Basalzellen - sowie in Zellen des Immunsystems wird ACh synthetisiert (Kummer et al. 2008). Nonneuronales ACh reguliert wahrscheinlich Zellproliferationen im Atemwegsepithel und ist an den Pathomechanismen der COPD (Chronic Obstructive Pulmonary Disease) beteiligt. Außerdem nimmt man an, dass epitheliales ACh an nAChR auf Nervenendigungen sensorischer Nervenfasern der Atemwege bindet (Kummer et al. 2008). Nikotinische AChR sind in den Atemwegen auch in neuroepithelialen Körperchen (NEB) zu finden. Pulmonale NEB sind in Gruppen zusammenliegende neuroendokrine Zellen im Atemwegsepithel (Spindel et al. 2003). Fu et al. (2003) zeigten an neugeborenen Hamstern, dass NEB-Zellen verschiedene nAChR exprimieren. Hierzu zählen die $\alpha 3\beta 2$ - und $\alpha 4\beta 2$ -Heteropentamere sowie die $\alpha 7$ -Homopentamere. $\alpha 7$ scheint an der Modellierung der Zellform beteiligt zu sein und beeinflusst Zell-zu-Zell-Kontakte (Wang 2001). Es besteht eine Koexpression der nAChR-Untereinheiten $\alpha 7$ und $\beta 2$ in NEB, die bisher in anderen Lungenzelltypen nicht verzeichnet werden konnte (Fu et al. 2003). Pulmonale NEB besitzen Chemorezeptoren zur

respiratorischen Kontrolle und werden durch vagale Afferenzen komplex innerviert (Fu et al. 2003). Brouns et al. entdeckten 2003 zwei verschiedene Populationen sensorischer Neurone, die selektiv pulmonale NEB in Rattenlungen kontaktieren. Zur ersten Gruppe zählen vagale sensorische Nervenfasern. Diese sind myelinisiert, Calbindin C28- und P2X₃-immunreaktiv, kontaktieren die NEB zwischen den endokrinen-Zellen in allen Ebenen der Atemwege und haben ihren Ursprung im Ganglion nodosum. Zur zweiten Gruppe gehören die spinalen sensorischen Nervenfasern. Sie kontaktieren die NEB hauptsächlich an ihrem basalen Pol, sind capsaicinempfindlich, SP- und CGRP-IR, exprimieren VR1 (Vanilloid Rezeptor 1) und haben ihren Ursprung in den DRG.

Nikotin hat in den Atemwegen und der Lunge verschiedene Effekte. Bisher nahm man an, dass die durch Nikotin induzierten Irritationen ausschließlich von nAChR vermittelt werden, die von nozizeptiven Nervenfasern der Haut und Schleimhaut exprimiert werden (Dussor et al. 2003, Simons et al. 2003, Lee et al. 2009). Neueste Studien zeigen allerdings, dass der chemosensitive Kationen-Kanal TRPA1 (transient receptor potential A1) maßgeblich an der Vermittlung Nikotin-induzierter Irritationen beteiligt ist (Talavera et al. 2009). In der Studie von Talavera et al. zeigten nozizeptive Neurone trotz der Gegenwart des nAChR-Blockers Hexamethonium Nikotin-induzierte Reaktionen. Mäuse mit TRPA1-Gendefizienz wiesen stark reduzierte Nikotin-induzierte Reaktionen auf. Obwohl der von Nikotin induzierte Effekt langandauernd ist, kommt es an den nAChR zu einer raschen Desensibilisierung. Nikotin stimuliert auch Bitterrezeptoren (Rose et al. 1984, Rose et al. 1985, Schultz et al. 1991, Hong et al. 1995, Perkins et al. 2001, Dehkordi et al. 2006, Lee et al. 2007). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Auffassung vom nAChR als einzige Bindungsstelle für Nikotin an nozizeptiven Nervenfasern nicht korrekt ist und dass noch weitere Forschungsarbeit nötig ist, um genauere Aussagen über die Vermittlung Nikotin-induzierter Effekte zu treffen.

Auf pulmonale sensorische Neurone und nAChR verschiedener Subpopulationen hat Nikotin direkt stimulierende Wirkung. Von allen sensorischen Strukturen werden vor allem die C-Fasern und RAR durch Nikotin stimuliert (Lee et al. 2007). Nikotin-induzierte Erregung der bronchopulmonalen RAR und C-Fasern ist konzentrationsabhängig und kann durch Hexamethonium vollständig unterdrückt werden, während die chemisch oder mechanisch induzierte Aktivierung erhalten bleibt. Nikotin aktiviert also RAR und C-Fasern über eine direkte Wirkung an neuronalen nAChRs (Xu et al. 2007). Darauf deutet auch der vorübergehende, abrupte Anstieg der Kalziumkonzentration nach einer Aktivierung der RAR und C-Fasern hin (Lee et al. 2009). Nikotin wirkt unter anderem an verschiedenen nAChR in

verschiedenen Stellen des Bronchialbaums und löst Atemwegsirritationen, Husten, Schleimsekretion und Bronchokonstriktion aus. Diese Effekte können durch lokale intrapulmonale Mechanismen, aber auch durch Stimulation von sensorischen Endigungen in den Atemwegen und der Lunge ausgelöst werden (Xu et al. 2007, Lee et al. 2007). Elektrophysiologische Studien zeigten einen direkt stimulierenden Effekt von Nikotin auf vagale pulmonale Neurone (Lee et al. 2007, Xu et al. 2007). Dabei hat Nikotin einen direkt stimulierenden Effekt auf pulmonale sensorische Neurone und nAChR verschiedener Kombinationen an α - und β -Untereinheiten (Dehkordi et al. 2008). Nach chronischer Nikotिंगabe lässt sich ein Anstieg der $\alpha 7$ -Expression verzeichnen (Sekhon 1999). Auch ältere Studien (Henningfield et al. 1985) zeigten bereits, dass Nikotin Husten und Atemwegsirritationen auslöst. Um sicher zu gehen, dass nicht andere Inhaltsstoffe des Zigarettenrauches für diese Effekte verantwortlich sind, verabreichten sie Nikotin intravenös. Bei Rauchern löste auch die intravenöse Gabe von Nikotin Husten und Atemwegsirritationen aus. Weitere Studien zeigten cholinerge Mechanismen in der Lungenentwicklung. Chronische Nikotinbelastung der Mütter verursachte einen signifikanten Anstieg der Anzahl an NEB-Zellen und einen Anstieg der $\alpha 7$ -nAChR-Expression in der fetalen Affenlunge (Schuller et al. 2003).

Der Großteil der bisher veröffentlichten Studien beschäftigt sich mit vagal sensorischen Afferenzen, während über die spinalen sensorischen Afferenzen erst wenig bekannt ist. Daher liegen auch weitaus mehr Informationen über die Rolle der nAChR in vagalen sensorischen Nervenfasern der Atemwege vor. Gu et al. (2008) isolierten 20 pulmonale vagale sensorische Neurone aus Ratten und fanden mRNA der neuronalen nAChR-Untereinheiten $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ und $\alpha 7$ sowie $\beta 2$, $\beta 3$ und $\beta 4$. Die Untereinheiten $\alpha 2$ und $\alpha 3$ konnten nicht gefunden werden und auf die Untereinheiten $\alpha 9$ und $\alpha 10$ wurde nicht getestet. Da diese Ergebnisse aus einem Pool multipler Neurone stammten, bieten sie im einzelnen keine genauen Hinweise darauf, von welcher Qualität die Neurone sind und aus welchen Untereinheiten die nAChR, die sie exprimieren, zusammengesetzt sind.

Über nAChR in spinalen Atemwegsafferenzen liegen derzeit noch keine Studien vor.

2.4 Retrograde neuronale Markierung

Die Grundlage für die retrograde neuronale Markierung ist der axonale (axoplasmatische) Transport. Mit diesem Begriff wird die gesteuerte Beförderung von Substanzen zwischen dem Perikaryon und der Axonendigung bezeichnet. Man unterscheidet anterograden (vom Perikaryon zur Nervenendigung) und retrograden Transport (vom Bouton zum Perikaryon). Der anterograde Transport hat eine schnelle und eine langsame Komponente, während der retrograde Transport immer schnell abläuft. Der Transport basiert auf dem polar strukturierten Zytoskelett. Der schnelle axonale Transport erreicht Geschwindigkeiten von 400 mm pro Tag, er befördert ausschließlich membranumhüllte Organellen unterschiedlichster Größe. Der Transport benötigt Energie, mit Hilfe von Motorproteinen verläuft er entlang der Neurotubuli. Für den retrograden axonalen Transport steht Dynein als Motorprotein zur Verfügung. Mit einer Geschwindigkeit von 200-300 mm pro Tag befördert es retrograde Transportvesikel in das Perikaryon.

Die Vesikel des retrograden Transports sind modifizierte Endosomen. Neben den Abbauprodukten aus dem intrazellulären Katabolismus enthalten sie unterschiedlichste Substanzen aus dem Extrazellulärraum, die durch Endozytose in die Nervenzelle aufgenommen werden. Das können Abbauprodukte aus dem Extrazellulärraum, Nervenwachstumsfaktoren, aber auch Tracerfarbstoffe sein. Auch neurotrope Viren, wie z.B. das tollwuterregende Lyssavirus oder die Poliomyelitis-Viren, nutzen den retrograden neuronalen Transport, um an ihre Zielzellen bzw. ins ZNS zu gelangen.

Neuronales Tracing (trace = Spur) bezeichnet eine Methode zum „Aufspüren“ von neuronalen Verbindungen. Es beantwortet die Frage, woher eine neuronale Projektion stammt. Retrograder (zentripetaler) Transport läuft immer aktiv (= echtes Tracing) ab und funktioniert daher nur in vivo (siehe Abb. 2). Er ist meist langsamer als der anterograde Transport. Die Geschwindigkeit ist unter anderem von der Molekülgröße abhängig, dementsprechend gibt es schnelle und langsame Tracer.

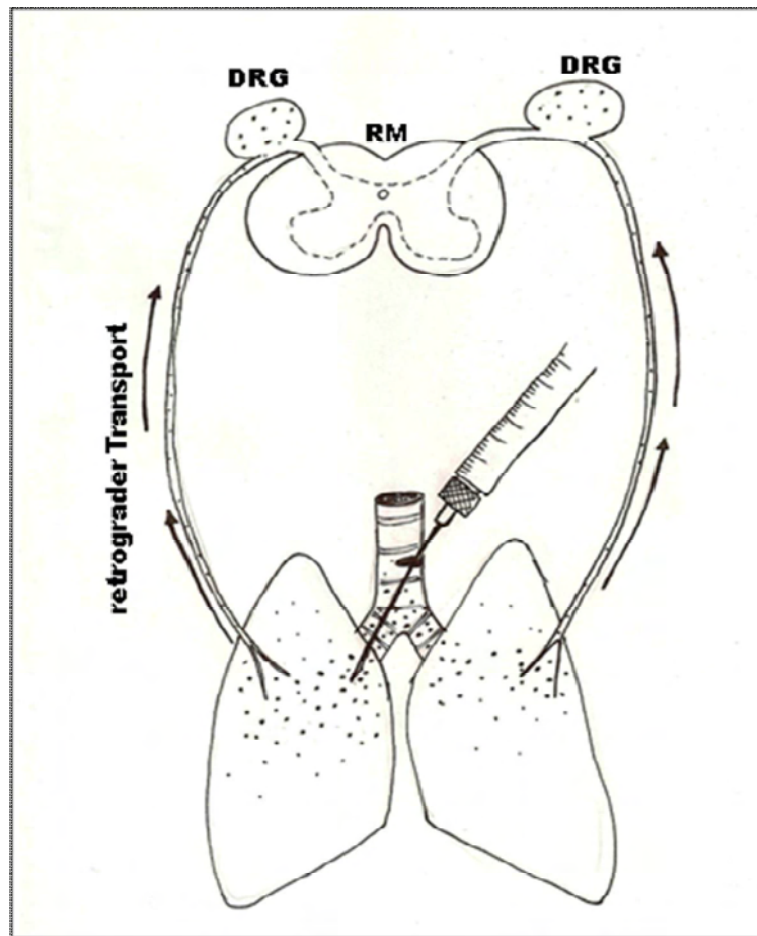


Abb. 2: Retrograde neuronale Markierung mit einer Mikropipette (in vivo). Durch eine Inzision zwischen zwei Trachealspangen wird die Kanüle der Mikropipette bis in die Lunge vorgeschoben und der Tracer appliziert. Der Tracer verteilt sich im Lungengewebe bis in die Trachea. Über retrograden axonalen Transport gelangt der Tracerfarbstoff bis in die DRGs.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Bei den Versuchstieren handelt es sich um BAC (bacterial artificial chromosome) transgene Mäuse, in denen enhanced green fluorescent protein (eGFP) unter der Kontrolle der endogenen $\alpha 3$ -nAChR-Untereinheit-Promotoraktivität exprimiert wird (Dr. Ibanez-Tallon, Berlin). Im Verlauf dieser Arbeit wurden 14 dieser Mäuse verwendet, von denen vier Mäuse (drei männliche und eine weibliche) mit einem Gewicht zwischen 25,6 und 34,7 g und in einem Alter von 26 bis 39 Wochen in die Studie eingingen.

Die Experimente wurden im Einklang mit der European Communities Council Directive vom 24. November 1986 (86/609/EEC) durchgeführt und vom Regierungspräsidium Giessen unter der Tierversuchs Nr.: V54-19 c 20-15 (1) GI 20/10 Nr.67/2007 genehmigt.

3.2 Tracerapplikation in die Atemwege

Die Mäuse wurden durch intraperitoneale Injektion eines Gemischs aus 0,05 mg/kg Atropin (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland), 12 mg/kg Rompun (Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) und 80 mg/kg Ketamin (Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg, Deutschland) anästhesiert. Nach Eintritt der Narkosewirkung wurde das Operationsfeld an der Halsunterseite auf einer Fläche von ca. 2 cm x 3 cm geschoren und mit Alkohol gereinigt. Mit einem Skalpell wurde ein ca. 2 cm langer Hautschnitt von kranial nach kaudal gesetzt und die Trachea konnte durch stumpfes Trennen der Mm. sternohyoidei entlang des Faserverlaufs freigelegt werden. Mittels einer Kanüle (Becton/Dickinson, Heidelberg, Deutschland) der Stärke 26G wurde eine Inzision zwischen zwei Trachealspangen im mittleren Drittel der Trachea gesetzt. Durch diese Inzision wurde die Kanüle einer 10 μ l-Mikropipette (Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Switzerland) in die Trachea eingeführt, ca. 2,5 cm in Richtung Lunge in den rechten Hauptbronchus vorgeschoben, wenn möglich in das Lungenparenchym gestoßen, und 2,5 μ l des Tracers Fast Blue (Polyscience, Inc., Warrington, USA) injiziert.

Nach Entfernung der Kanüle aus der Trachea wurde die Haut mittels einer 4-0 Vinyl-Naht (Ethicon, Johnson&Johnson, Norderstedt, Deutschland) mit zwei bis drei Einzelheften verschlossen. Die Tiere wachten im Durchschnitt ca. 30 min nach Beendigung der Operation aus der Narkose auf. Ließ die Wirkung der Narkose bereits vor Beendigung der Operation nach, wurden die Tiere mit Hilfe des Inhalationsnarkotikums Isofluran (Baxter,

Unterschleißheim, Deutschland) bis zur Beendigung der Operation in Narkose gehalten. Dazu genügte es, den Tieren einen mit Isofluran benetzten Wattetupfer für zwei bis drei Atemzüge vor die Nase zu halten. In den folgenden vier Tagen wurden die Mäuse einzeln in Käfigen mit ausreichend Nahrung, Wasser und Beleuchtung im Tag-/Nachtrythmus gehalten.

3.3 Perfusionsfixierung und Präparation des Gewebes

Vier Tage nach der Tracerapplikation in die Atemwege wurden die Mäuse mittels Inhalation einer Überdosis des Inhalationsnarkotikums Isofluran (Baxter, Unterschleißheim, Deutschland) getötet. Dazu wurden die Tiere mit einem mit Isofluran benetzten Tupfer in ein luftdicht abgeschlossenes Glas gesetzt, bis keine Atemexkursionen mehr erkennbar waren.

Der Thorax der toten Maus wurde mit einem beidseits ca. 1 cm parasternal geführten Schnitt eröffnet, so dass das Herz freilag und ca. 0,5 ml Heparin in den linken Ventrikel injiziert werden konnten. Das rechte Atrium wurde als Abfluss eröffnet. Anschließend wurde der linke Ventrikel eröffnet und ein Katheter wurde durch diesen in die Aorta ascendens vorgeschoben. Um einen Rückfluss des Fixans aus dem linken Ventrikel heraus zu verhindern, wurde eine Klemme aufgesetzt. Über den Katheter wurde 1 ml Heparin in ca. 200 ml Vorspüllösung und anschließend 200-300 ml der Fixationslösung Paraformaldehyd (PFA 4 %) perfundiert. Dieser Vorgang der Perfusion dauerte ca. 10 Minuten. Die Zusammensetzung der Lösung ist in Tabelle 1 angegeben. Nach Beendigung der Perfusion wurden die fixierten Mäuse ca. eine Stunde bei ca. 6 °C im Kühlschrank gelagert.

Anschließend erfolgte die Entnahme folgender Organe:

Thoraxpaket (inkl. Oesophagus, Trachea, Lungen, Herz und Thymus), Jugular-Nodose Ganglion Complex (JNC bds.), DRGs von C1 bis T5 (bds.), das Rückenmark im Bereich C1 bis C5 sowie bds. Superiour Cervical Ganglion (SCG) und Ganglion stellatum. Nach der Organentnahme wurden die Organe mehrfach über einen Zeitraum von 24 Stunden mit 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4, gewaschen und anschließend für ca. 12 Stunden in 18% saccharosehaltigem Phosphatpuffer kryoprotektiert. Hierauf folgte das Schockgefrieren der Organe. Dazu wurden diese auf Filterpapier (Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) in Tissue Tec (Sakura Finetec Europe B.V., Zoeterwoude, Niederlande) eingebettet und für kurze Zeit in flüssigen Stickstoff getaucht. Die gefrorenen Organe wurden in Parafilm (Pachiney Plastic Packaging, Menasha, Wisconsin, USA) gehüllt und im Gefrierschrank bei -80 °C gelagert.

Reagenz	Zusammensetzung
Vorspüllösung	2,5 % Polyvinylpyrrolidon (Roth, Karlsruhe, Deutschland) 0,9 % NaCl (Merck, Darmstadt, Deutschland), 0,5 % Procainhydrochlorid (Merck), pH 7,4
Fixans	4 % Paraformaldehyd (PFA) (Merck) in 0,1 M PP (s.u.)
0,1 M Phosphatpuffer (PP)	15,6 g/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (Merck) + 17,8 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (Fluka Biochemika, Steinheim, Deutschland), pH 7,4
PBS	28,75 ml Lösung A (31,2 g/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 96,20 ml Lösung B (17,8 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (Fluka Biochemika, Steinheim, Deutschland) vermischen, 22,4 g NaCl zufügen und auf 5 l mit destilliertem Wasser auffüllen, pH-Wert wird auf 7,4 eingestellt

Tab. 1: Benötigte Lösungen für die Perfusionsfixation.

3.4 Anfertigung der Gewebeschnitte

Am Kryostaten (Jung Frigocut 2800E, Leica, Bensheim, Deutschland) wurden von den DRGs 10 µm dicke Schnitte bei -20 °C angefertigt. Von einem DRG wurden bei vollständiger Aufarbeitung ca. 50 Schnitte gewonnen, welche auf Objektträger (Super-Frost, R. Langenbrinck, Teningen, Deutschland) gezogen wurden. Vom Thoraxpaket und dem Rückenmark wurden 20 µm dicke Schnitte angefertigt, von denen in etwa jeder fünfte Schnitt auf Objektträger gezogen wurde. Nach ca. 20 min Lufttrocknung wurden die Schnitte entweder bei -20 °C zwischengelagert, oder direkt zur weiteren Verarbeitung genutzt.

3.5 Immunfluoreszenz und Histochemie

Die luftgetrockneten Schnitte wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop (Olympus BX60, Hamburg, Deutschland) betrachtet. Mit Hilfe des adäquaten Filters konnten die durch den Tracer Fast Blue markierten Neurone lokalisiert werden. Die weiteren Schritte erfolgten lediglich mit den Schnitten, auf denen sich Fast Blue-positive Neurone befanden. Die übrigen Schnitte wurden mit Hilfe eines Skalpells von den Objektträgern entfernt. Die zu nutzenden Schnitte wurden mit einem Fettstift (Super Pap Pen, Manufactured for Immunotech at Beckman Coulter Company, Marseille, Frankreich) umkreist. Um eine Austrocknung zu verhindern, befanden sich die Objektträger während der folgenden Schritte in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur und, soweit es die Arbeitsschritte zuließen, unter Lichtabschluss. Auf die Schnitte wurde zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen 50 % PBS+S (PBS + 22,4 g NaCl) enthaltendes Pferdeserum als Blocklösung gegeben. Nach einer Stunde wurde das Pferdeserum abgesaugt. Die Primärantikörper Anti-CGRP aus der Ziege und Anti-NF68 aus dem Kaninchen wurden mit PBS+S auf ein für sie bestimmtes Optimum (Tab. 2) verdünnt und auf die Schnitte gegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht. Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, wurden die Schnitte am folgenden Tag zweimal für je 10 min in einer Küvette in PBS, pH 7,4, gewaschen. Im Anschluss wurden die auf ihr Optimum verdünnten Sekundärantikörper (Tab. 3), ein Cy3-gekoppelter Anti-Ziegen-IgG-Antikörper aus dem Esel und ein Cy5-gekoppelter Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (F(ab)₂) aus dem Esel, auf die Schnitte gegeben, eine Stunde inkubiert und anschließend zweimal 10 min in PBS gewaschen. Anschließend wurde die Flüssigkeit von den Objektträgern abgesaugt, Carbonat-gepuffertes Glycerol (pH 8,6) aufgetragen und mit einem Deckgläschen (R. Langenbrinck, Emmendingen,

Deutschland) eingedeckelt. In jeder Inkubationsperiode wurden zwei bis drei Gewebeschnitte, bei denen keine durch Fast Blue markierten Neurone zu finden waren, als Negativkontrolle auf unspezifische Bindung der Sekundärseren getestet. Die Primärantikörper wurden dazu durch PBS+S ersetzt. Außerdem wurde für CGRP eine Präabsorptionskontrolle durchgeführt, bei dem der Antikörper (Anti-CGRP aus der Ziege) vor der Inkubation mit dem immunogenen Peptid (Ratten-CGRP) (Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen, Deutschland) präinkubiert wurde (0,5 µg Peptid pro ml endverdünntes Serum), so dass das Peptid die Bindungsstellen des Antikörpers besetzt. Der Ansatz der Präabsorption wurde eine Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach dieser Präabsorption kann im Gewebeschnitt keine spezifische Antikörperbindung mehr auftreten.

Antigen	Hersteller	Wirtsspezies	Verdünnung
CGRP	Biotrend	Ziege	1:4000
NF-L	Chemicon (Hofheim, Deutschland)	Kaninchen	1:500

Tab. 2: Primärantikörper

Antigen	Konjugat	Hersteller	Wirtsspezies	Verdünnung
Ziegen-Ig	Cy3	Chemicon	Esel	1:800
Kaninchen-Ig	Cy5	Dianova (Hamburg, Deutschland)	Esel	1:800

Tab. 3: Sekundärantikörper

3.6 Auswertung

In der vorliegende Studie wurden vier Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig dargestellt. Die angefertigten Gewebeschnitte wurden mittels eines Fluoreszenzmikroskops (Axioplan 2 Imaging, Zeiss, Jena, Deutschland) ausgewertet. Die durch Fast Blue markierten Neurone wurden erneut aufgesucht und in vier Filtern (Tab. 4) bei zwanzigfacher Objektivvergrößerung mit einer Digitalkamera (Model No. DXC-390P, BCCD Color Video Camera, Sony, Japan) fotografiert. Die Bilder wurden mit dem Programm Axio Vision (Zeiss, Jena, Deutschland) auf dem Computer gespeichert. Am PC wurden die Bilder anschließend ausgewertet. Es wurden lediglich Neurone ausgezählt und ausgemessen, deren Zellkern sichtbar war, um Doppelzählungen zu vermeiden. Die Messung der Zellgröße wurde mit dem Programm Image J (plattformunabhängiges Bildbearbeitungs- und Bildverarbeitungsprogramm von Java) vorgenommen.

Fluorochrom	Dichroischer Spiegel (nm)	Erregerfilter (nm)	Sperrfilter (nm)
Fast Blue	400	360 - 370	420 – 460
FITC	455	460 – 490	515 – 550
Cy-3	555	525 – 560	570 – 650
Cy-5	590 - 650	590 - 650	665 - 740

Tab. 4: Eigenschaften der Filter für die Fluoreszenzmikroskopie.

AMCA = Aminomethyl-Coumarin-Acetat, FITC = Fluoresceinisothiocyanat,

Cy-3 = Carbocyanin3, Cy-5 = Indodicarbocyanin.

4 Ergebnisse

4.1 Verteilung des Tracers Fast Blue nach trachealer/pulmonaler Applikation

4.1.1 Tracerverteilung am Applikationsort

Vier Tage nach der Tracerapplikation wurden die Mäuse getötet und u.a. das Thoraxpaket entnommen. Größere Anhäufungen des Tracerfarbstoffes konnten schon makroskopisch in der Lunge und/oder der Trachea erkannt werden.

Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden die angefertigten Schnitte betrachtet und die Verteilung des Tracers konnte genauer bestimmt werden. Bei drei Tieren (Maus 1 bis 3) konnte der Tracerfarbstoff in der Lunge nachgewiesen werden (Abb. 3), jedoch bei allen in unterschiedlicher Intensität. Während bei Maus 1 der größte Anteil der Tracermenge in der Lunge zu finden war und weniger in der Trachea, fand sich bei den Mäusen 2 und 3 eine Traceranhäufung in der Trachea (Abb. 4). Nur wenige Bereiche der Lunge waren mit dem Tracerfarbstoff markiert. In der Lunge der Maus 4 konnte kein Tracer gefunden werden. Der Tracerfarbstoff war in der Trachea bis hin zur Bifurcatio tracheae zu finden. Bei diesem Tier wurde offensichtlich während der Operation die Kanüle der Hamilton-Mikropipette nicht bis in den rechten Hauptbronchus vorgeschoben.

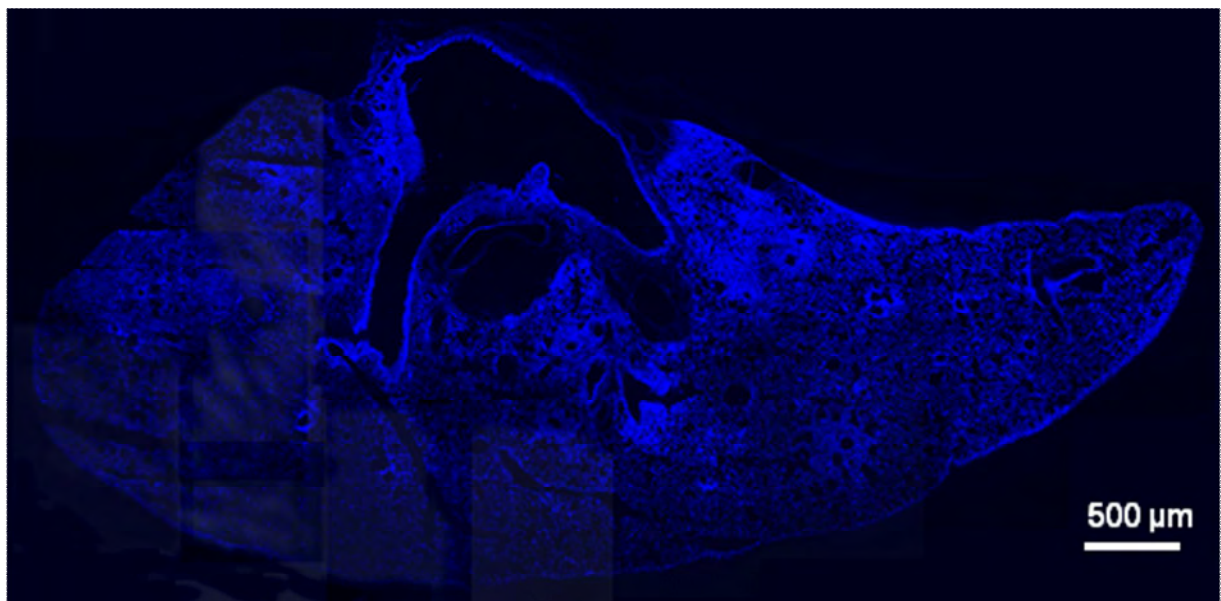


Abb. 3: Dargestellt ist ein Querschnitt durch die Lunge der Maus 1 vier Tage nach dem Tracing.

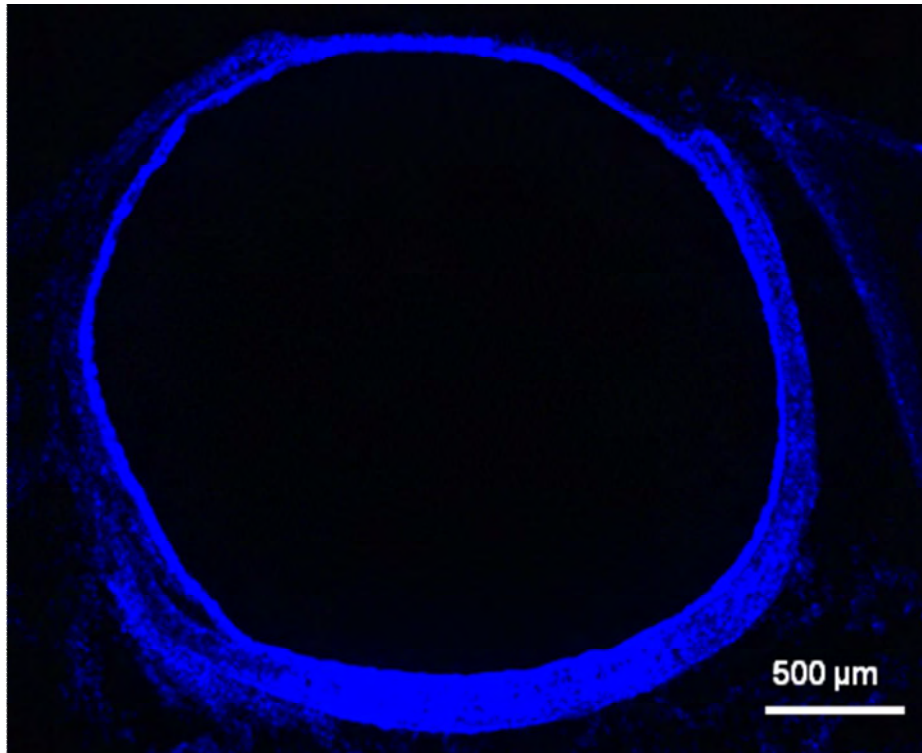


Abb. 4: Dargestellt ist ein Querschnitt durch die Trachea der Maus 2 vier Tage nach dem Tracing.

4.1.2 Tracerverteilung in applikationsfernen Organen

Im entnommenen Rückenmark (C1-C5) konnten bei allen Mäusen im Bereich C1-C2 Fast Blue-markierte Motoneurone in der medialen Basis des Vorderhorns gefunden werden (Abb. 5). Dies spricht dafür, dass die infrahyalen Muskeln, die die Trachea bedecken, mit dem Tracerfarbstoff in Kontakt gekommen waren. Um sicherzugehen, dass Muskelafferenzen der infrahyalen Muskulatur nicht in die Auswertung mit eingehen, wurden die ersten vier zervikalen DRGs nicht weiter bearbeitet und ausgewertet.

In den anderen zum Thoraxpaket gehörenden Organen konnte kein Fast Blue festgestellt werden.

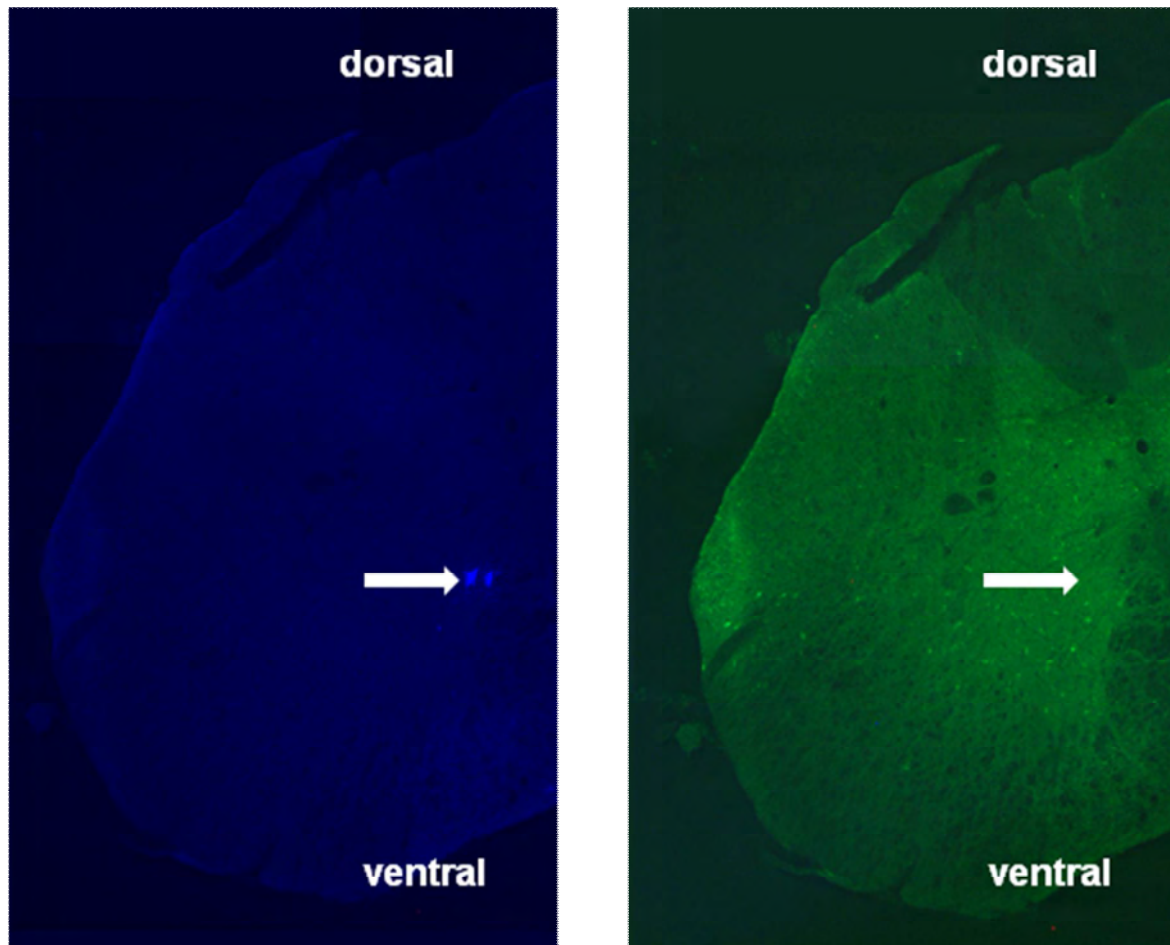


Abb. 5: links: Dargestellt ist ein Querschnitt durch das halbe Halsmark im Bereich C1 bis C2. Der Pfeil zeigt Fast Blue-positive Motoneurone.

rechts: Dargestellt ist der gleiche Querschnitt des Halsmarks wie in der linken Abbildung, zur besseren Übersicht im FITC-Filter. Der Pfeil zeigt die Lokalisation der Fast Blue-positiven Motoneurone in der medianen Basis des Vorderhorns.

4.1.3 Segmentale Verteilung des Tracers Fast Blue in DRG-Neuronen

Bei der Betrachtung der segmentalen Verteilung des Tracers in den DRG-Neuronen zeigten die DRGs C5 sowie T1 und T2 die größte Anzahl an retrograd markierten Neuronen. In den DRGs C5 der rechten Körperhälfte befanden sich 13% aller retrograd markierter Neurone. 18% konnten in den DRGs T1 der rechten Körperhälfte gezählt werden und 19% in den DRGs T2 der linken Körperhälfte. In den DRGs T4 und T5 befanden sich keine retrograd markierten Neurone.

Insgesamt 14 DRGs konnten nicht in die Studie aufgenommen werden, da sie im Laufe der Bearbeitung, von der Präparation bis hin zur Immunhistologie, Defekte erlitten, die eine Auswertung ausschlossen. Diese sind in Tab. 5 und 6 mit „X“ gekennzeichnet.

Die Gesamtzahl retrograd markierter Neurone in den DRGs jeder Maus (zwischen C5 und T5) variierte zwischen 27 und 46.

52% aller retrograd markierter Neurone befanden sich in der rechten und 48% in der linken Körperhälfte. Bei der Auswertung der retrograd markierten DRG-Neurone der Maus 1 fanden sich 74% der Neurone in den rechtsseitigen DRGs. Im Falle der Maus 4 befanden sich 70% auf der linken Seite (Abb. 6).

rechts	Maus 1		Maus 2		Maus 3		Maus 4	
	n	%	n	%	n	%	n	%
C5	5	19	3	8	9	20	2	6
C6	2	7	4	10	0	0	0	0
C7	X	X	0	0	X	X	0	0
C8	3	11	0	0	X	X	1	3
T1	2	7	12	31	9	20	3	10
T2	5	19	X	X	2	4	2	6
T3	3	11	3	8	2	4	1	3
T4	0	0	0	0	0	0	X	X
T5	0	0	0	0	0	0	X	X

Tab. 5: Anzahl Fast Blue markierter Neurone in den DRGs von C5 bis T5 der rechten Körperhälfte (X = fehlend oder nicht auswertbar)

links	Maus 1		Maus 2		Maus 3		Maus 4	
	n	%	n	%	n	%	n	%
C5	2	7	2	5	7	15	X	X
C6	2	7	5	13	4	9	0	0
C7	0	0	4	10	1	2	0	0
C8	0	0	X	X	3	7	0	0
T1	1	4	X	X	2	4	4	13
T2	X	X	3	8	7	15	17	55
T3	2	7	3	8	X	X	1	3
T4	X	X	X	X	0	0	0	0
T5	0	0	0	0	0	0	X	X
Ges.:	27	100	39	100	46	100	31	100

Tab. 6: Anzahl Fast Blue markierter Neurone in den DRGs von C5 bis T5 der linken Körperhälfte
(X = fehlend oder nicht auswertbar)

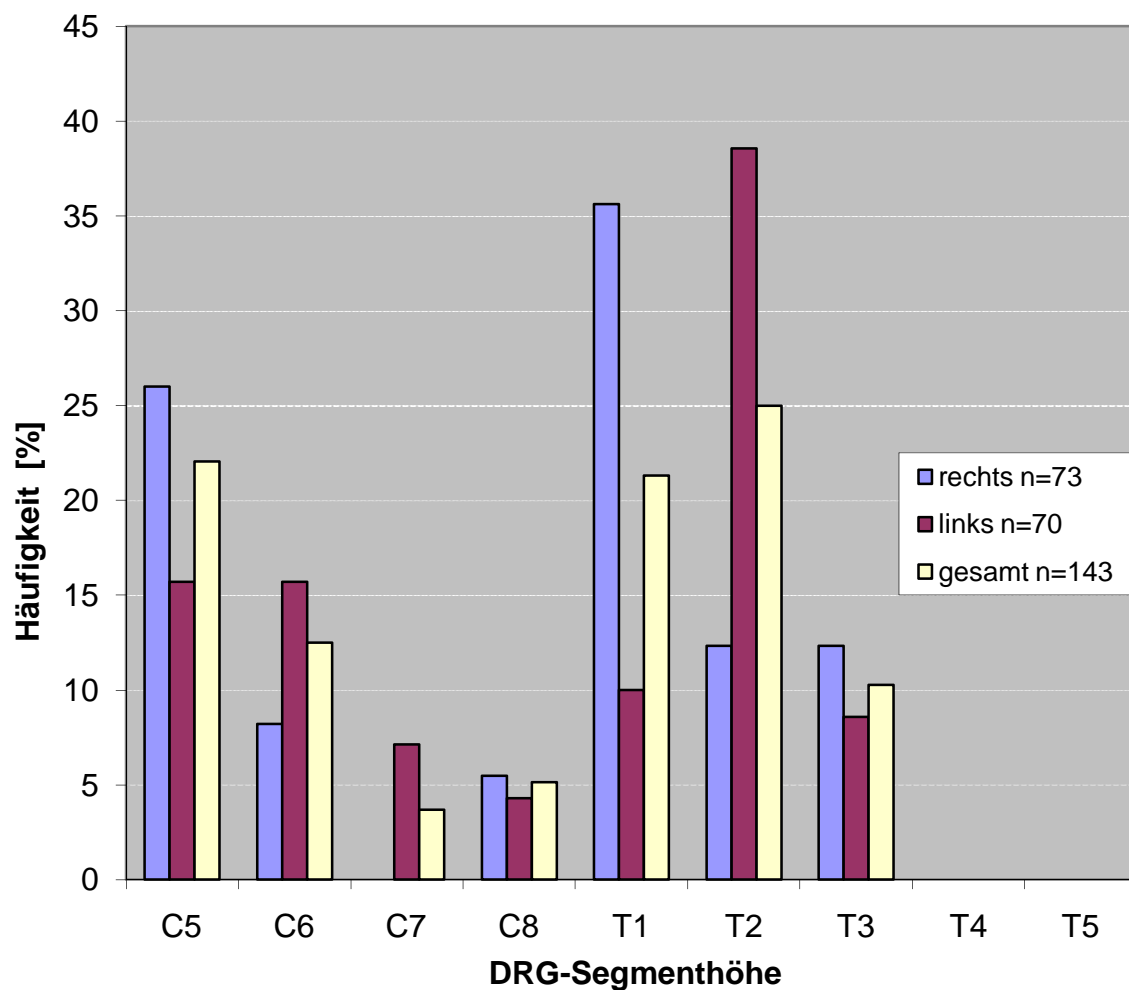


Abb. 6: Prozentuale Verteilung der mit Fast Blue retrograd markierten DRG-Neurone auf die Segmente C5 bis T5 im Seitenvergleich.

4.2 Perikaryondurchmesser der retrograd markierten DRG-Neurone zwischen C5-T5

Die Abbildung 7 zeigt die Größenverteilung der Perikaryen Fast Blue-positiver DRG-Neurone. Der größte Anteil der retrograd markierten Neurone besaß eine Größe zwischen 15-25 μm . Weniger als ein Prozent war im Durchmesser kleiner als 10 μm und ca. 2 Prozent der Neurone besaß eine Größe von über 40 μm . Der Mittelwert des Perikaryondurchmessers aller retrograd markierter Neurone betrug 23,7 μm .

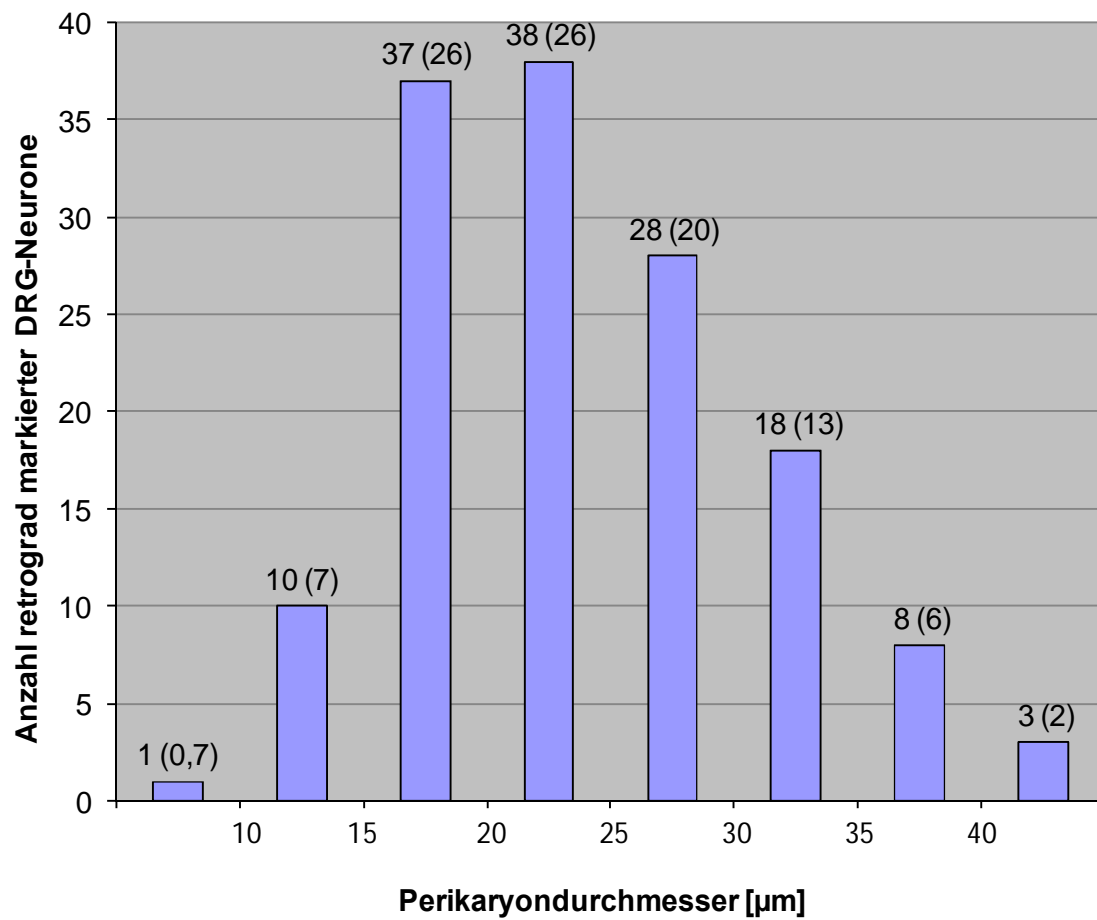


Abb. 7: Größenverteilung der retrograd markierten DRG-Neurone aus C5-T5. Über den Balken ist die Anzahl der Neurone und in Klammern die Häufigkeit in Prozent angegeben (n=143 Neurone aus 4 Mäusen).

4.3 Neurochemische Charakteristika Fast Blue-positiver DRG-Neurone

4.3.1 Häufigkeit immunhistochemisch definierter Subpopulationen Fast Blue-markierter DRG-Neurone

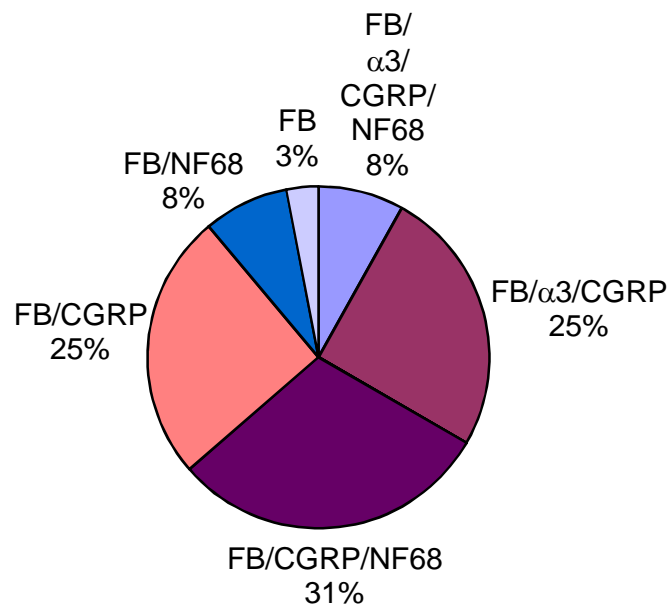


Abb. 8: Häufigkeit immunhistochemisch definierter Subpopulationen Fast Blue-markierter DRG-Neurone (n=143 Neurone aus 4 Mäusen)

Die Fast Blue-markierten DRG-Neurone zwischen C5 und T5 wurden vermessen und auf Immunreaktivität bzgl. CGRP und NF68 sowie auf das Vorkommen der $\alpha 3$ -nAChR-Untereinheit untersucht (Abb. 8). 93% der Neurone waren CGRP-positiv, NF68-positiv und $\alpha 3$ -positiv in verschiedenen Kombinationen. Lediglich 3% der retrograd markierten DRG-Neurone wiesen weder eGFP noch eine der Immunreaktivitäten auf (Abb. 9 und 11). Von insgesamt acht Kombinationsmöglichkeiten hinsichtlich der drei Merkmale konnten sechs Subpopulationen tatsächlich ausgemacht werden. Mit 30% waren die retrograd markierten Neurone, die eine Immunreaktivität für CGRP und NF68 aufwiesen, jedoch $\alpha 3$ -negativ waren, am häufigsten vertreten (Abb. 10 und 11). Mit jeweils 25% folgten zwei Subpopulationen, eine $\alpha 3$ - und CGRP-positive (Abb. 11 und 12) und eine weitere mit Immunreaktivität lediglich für CGRP (Abb. 10). Die verbleibenden zwei Subpopulationen machten jeweils 8%

der retrograd markierten Neurone aus. Dabei handelte es sich um die Subpopulation, die sich $\alpha 3$ /CGRP/NF68-positiv zeigte (Abb. 13), sowie um diejenige, die nur für NF68 immunreaktiv war (Abb. 14). Zwei mögliche Kombinationen konnten bei keinem der mit Fast Blue-retrograd markierten Neurone festgestellt werden. Es konnten keine retrograd markierten Neurone nachgewiesen werden, die lediglich $\alpha 3$ -positiv oder $\alpha 3$ /NF68-positiv waren. Unter den Fast Blue-negativen, also nicht nachweislich zu den Atemwegen projizierenden Neuronen, kamen diese zwei Kombinationen jedoch vor (Abb. 13 und Abb. 15).

Aufgrund geringer Neuronenzahlen wurde zur statistischen Analyse auf Unterschiede bezüglich der Häufigkeit der vorkommenden Subpopulationen Fisher`s exakter Test angewendet. Die Subpopulationen, die keine Immunreaktivität für NF68 aufwiesen, kamen signifikant häufiger vor als die Subpopulationen, die Immunreaktivität für NF68 zeigten ($p = 0,028$ exakte Signifikanz, 2-seitig).

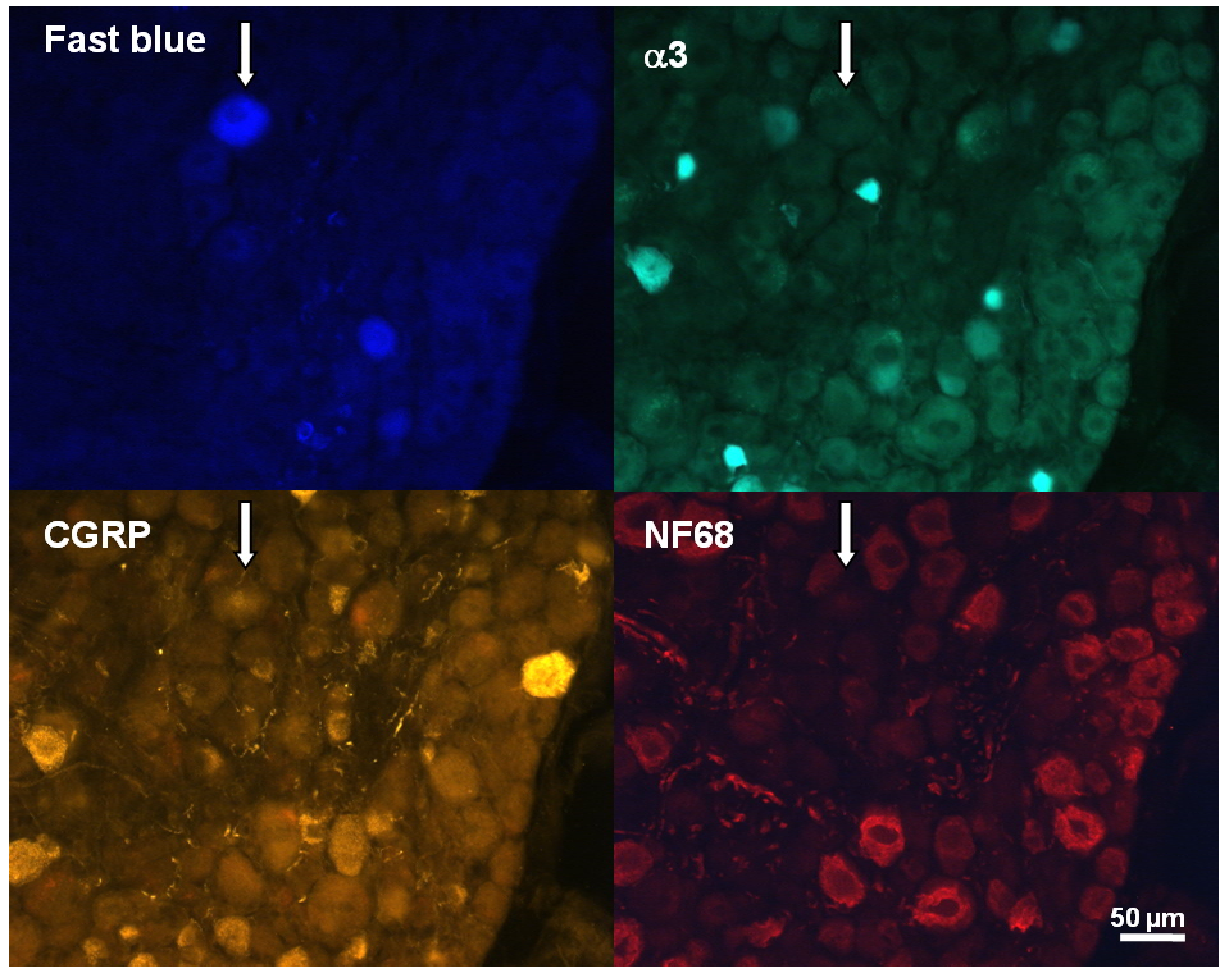


Abb. 9: Retrograd markiertes, Fast Blue-positives Neuron im DRG. Das Neuron ist $\alpha 3$ -, CGRP- und NF68-negativ.

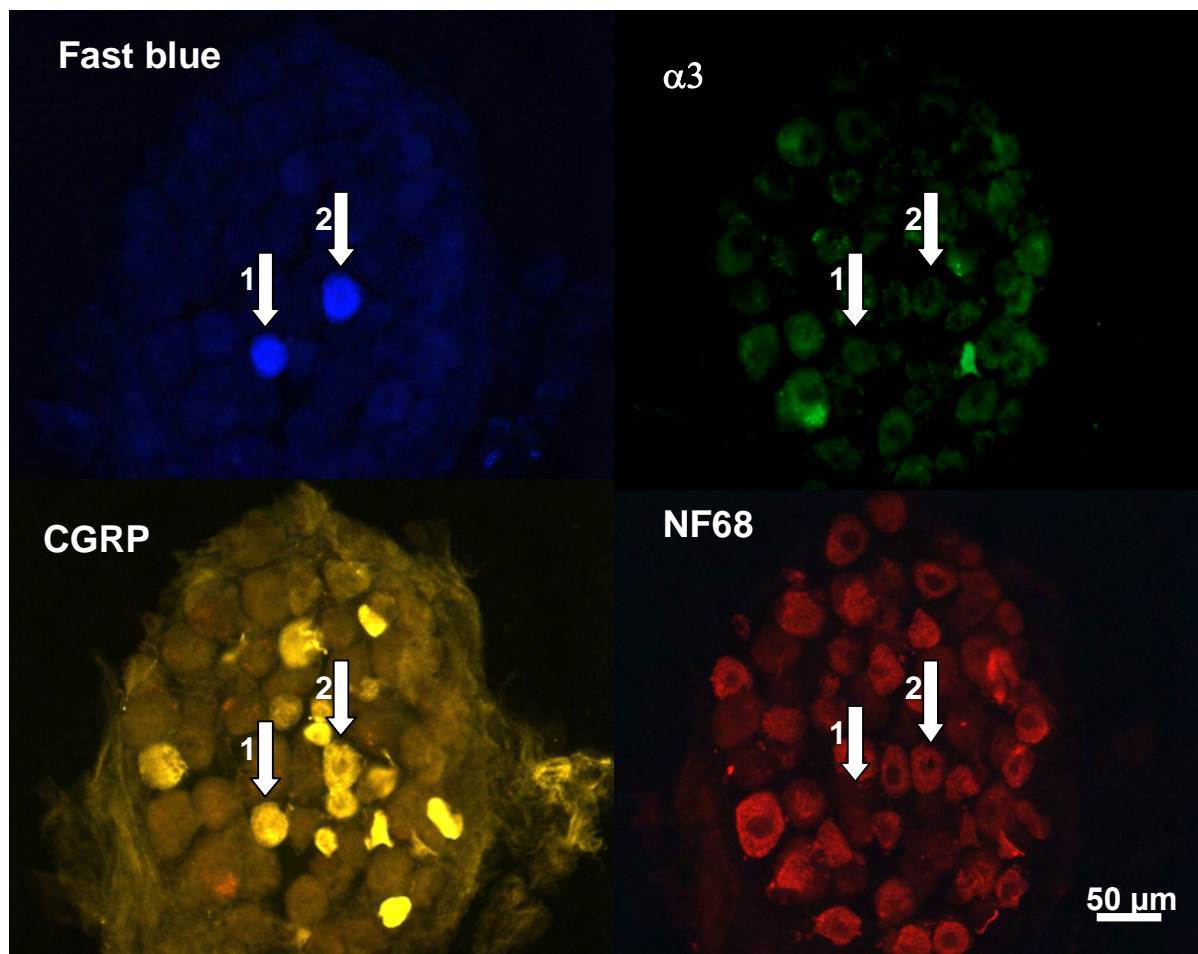


Abb. 10: Dargestellt ist ein Schnitt durch ein DRG mit zwei retrograd markierten Neuronen. Neuron 1 zeigt Immunreaktivität für CGRP, ist aber $\alpha 3$ - und NF68-negativ. Neuron 2 weist Immunreaktivität für CGRP und NF68 auf, ist aber $\alpha 3$ -negativ.

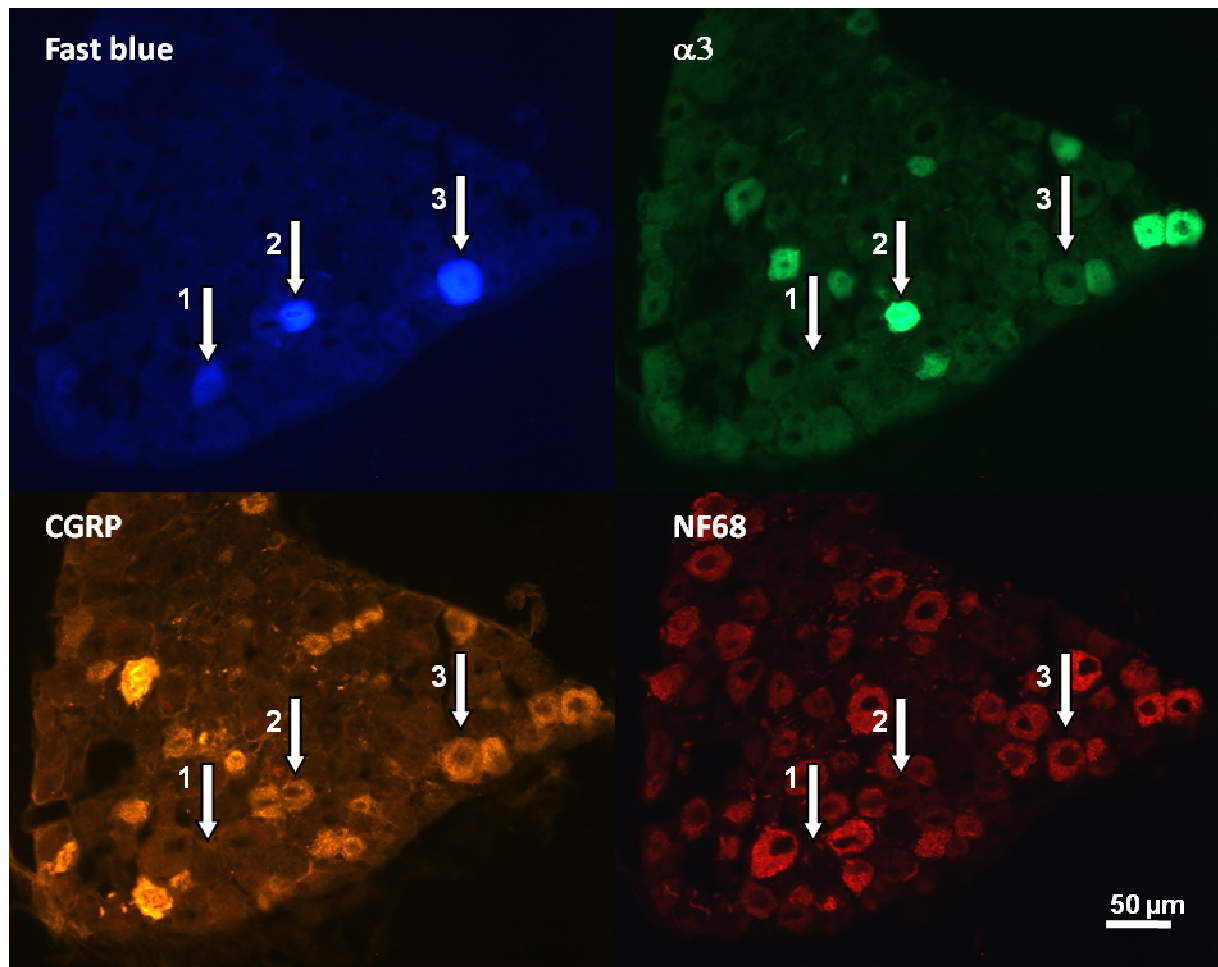


Abb. 11: Dargestellt ist ein Schnitt durch ein DRG mit drei retrograd markierten, Fast Blue-positiven Neuronen.

Neuron 1 ist α3-, CGRP- und NF68-negativ.

Neuron 2 ist α3- und CGRP-positiv, jedoch NF68-negativ.

Neuron 3 zeigt Immunreaktivität für CGRP und NF68, ist jedoch α3-negativ.

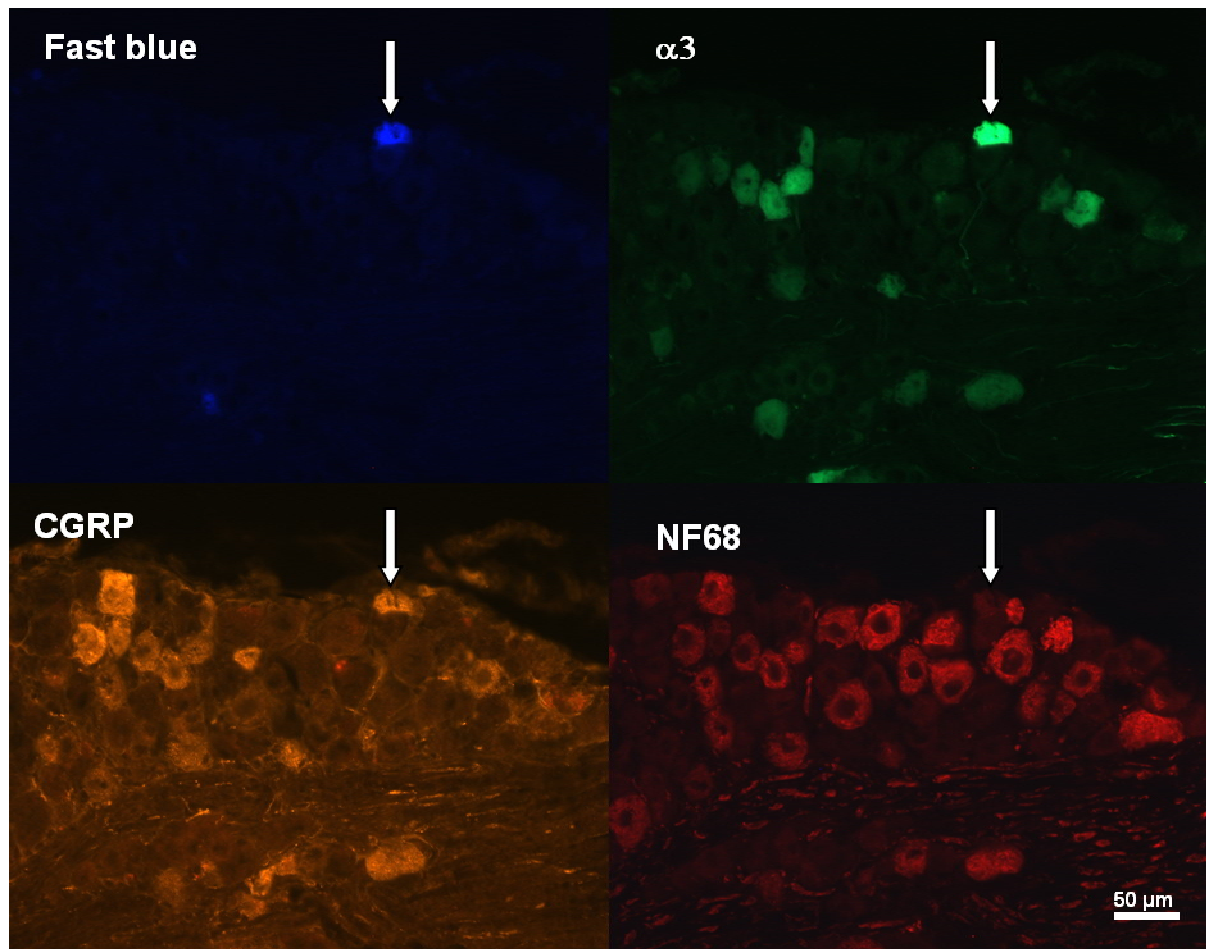


Abb. 12: Retrograd markiertes, Fast Blue positives Neuron im DRG-Schnitt. Das Neuron ist $\alpha 3$ - und CGRP-positiv, jedoch NF68-negativ.

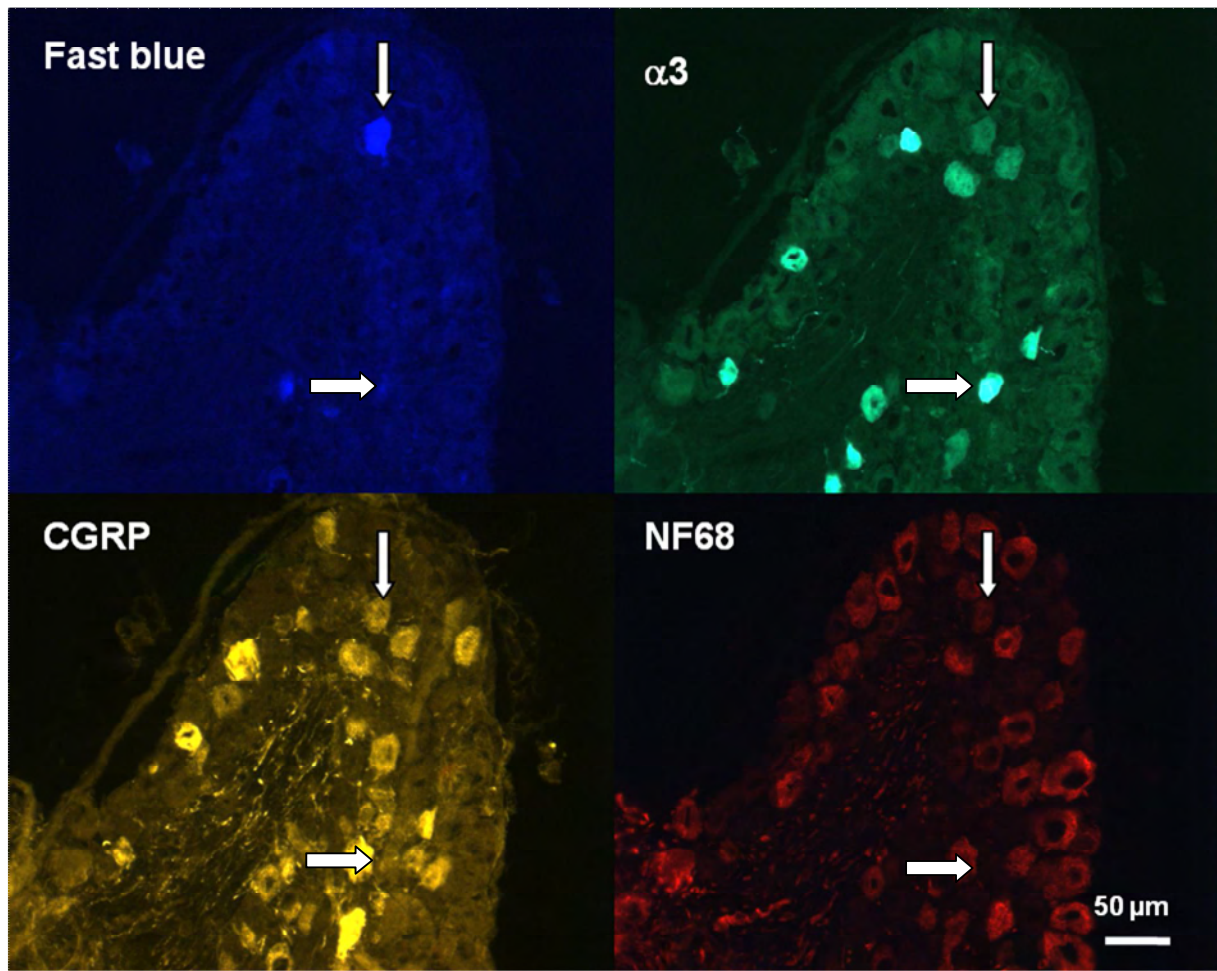


Abb. 13: Dargestellt ist ein Schnitt durch ein DRG. Dreifachmarkierung eines retrograd markierten, Fast Blue-positiven Neurons (senkrechter Pfeil). Dieses Neuron ist $\alpha 3$ -positiv, CGRP-positiv und NF68-positiv. Der horizontale Pfeil zeigt ein $\alpha 3$ -positives Neuron, das keine retrograde Markierung aufweist und keine Immunreaktivität für CGRP und NF68 zeigt.

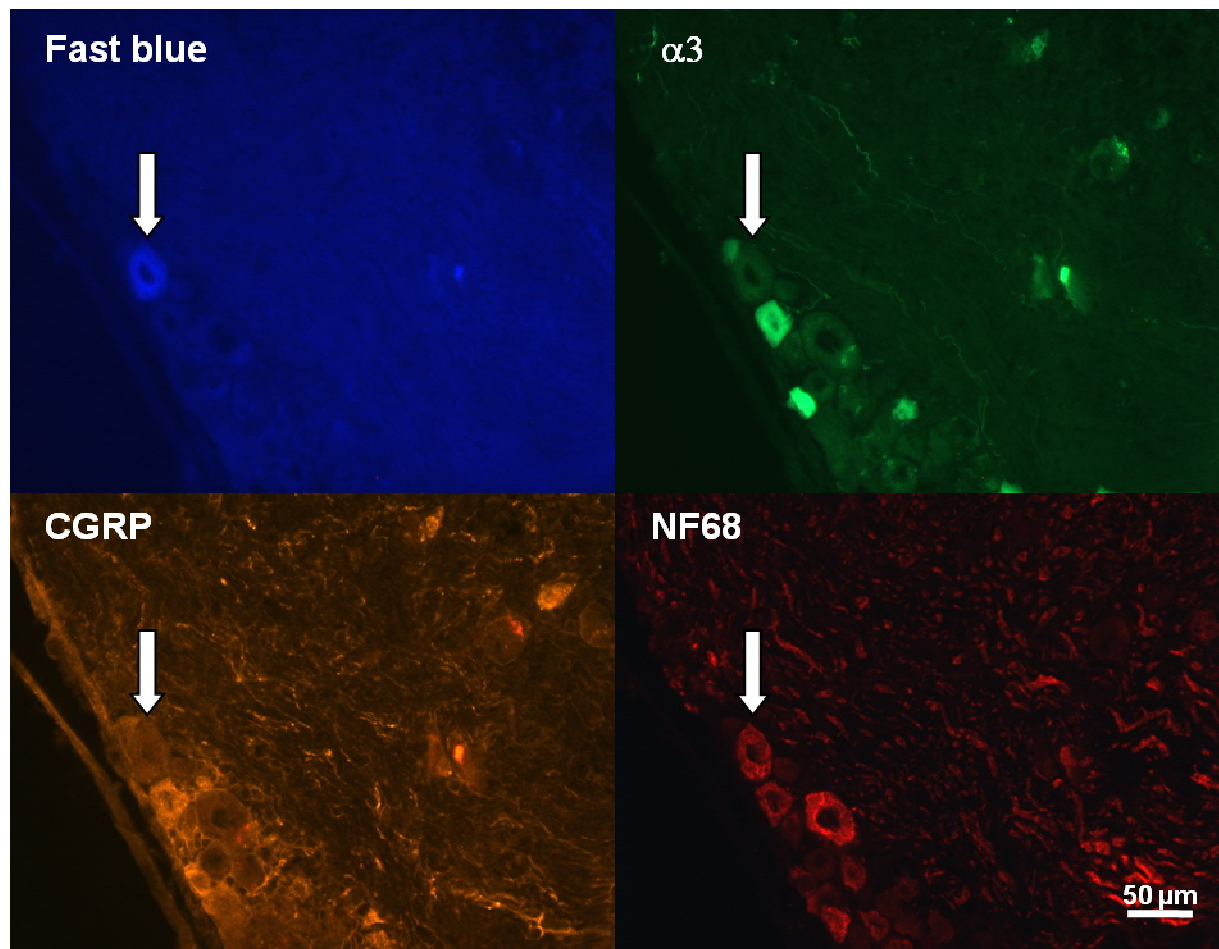


Abb. 14: Retrograd markiertes, Fast Blue-positives Neuron im DRG-Schnitt. Das Neuron ist $\alpha 3$ - und CGRP-negativ. Für NF68 ist es allerdings immunreaktiv.

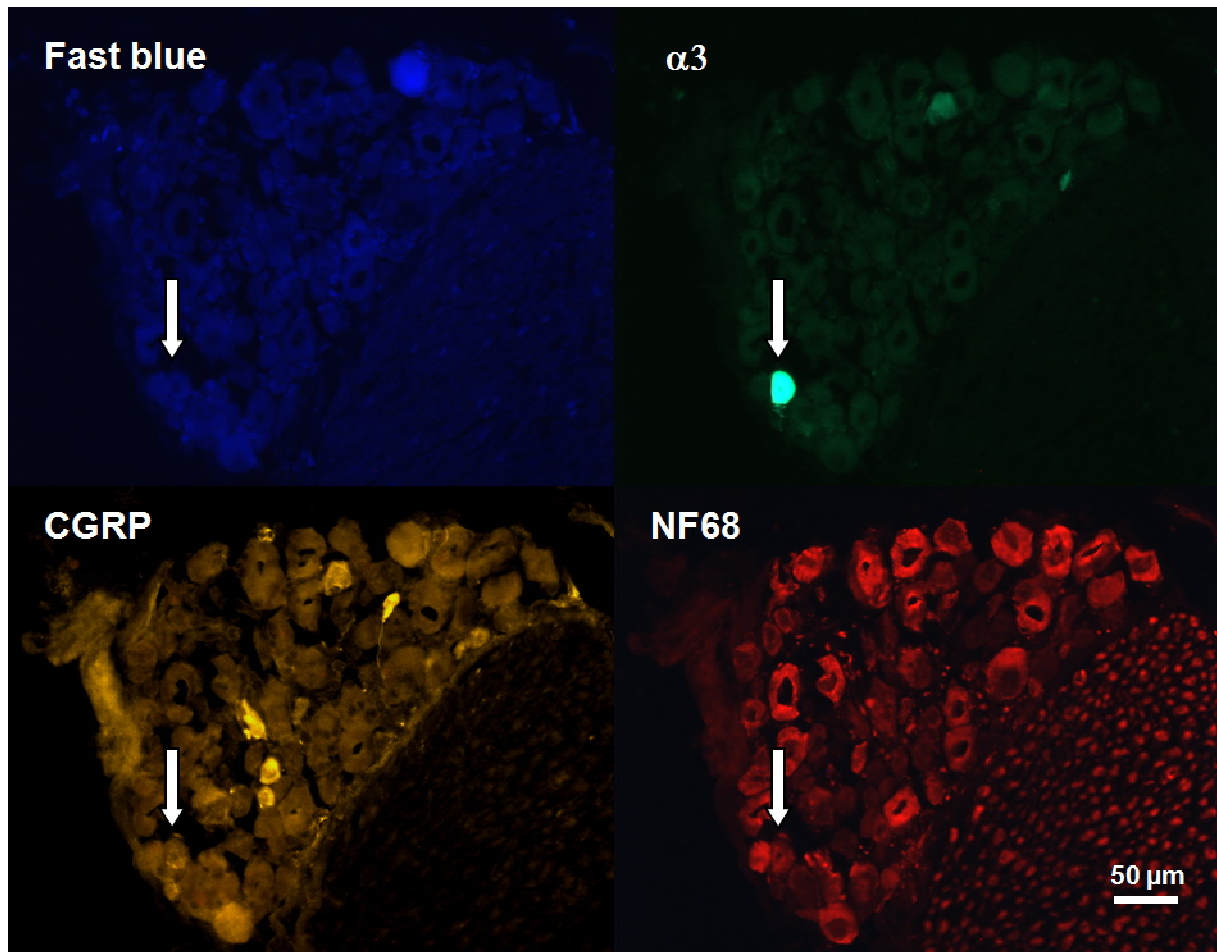


Abb. 15: Dargestellt ist ein Schnitt durch ein DRG. Das mit dem Pfeil markierte Neuron weist keine retrograde Markierung auf. Es ist $\alpha 3$ -positiv, zeigt keine Immunreaktivität für CGRP, für NF68 ist es allerdings immunreaktiv. Eine solche Subpopulation kam bei den mit Fast Blue markierten DRG-Neurone nicht vor.

4.3.2 Perikaryondurchmesser im Zusammenhang mit den verschiedenen Subpopulationen

Die retrograd markierten DRG-Neurone, die Immunreaktivität für NF68 aufwiesen, besaßen im Durchschnitt einen großen Perikaryondurchmesser. $\alpha 3$ -positive DRG-Neurone hingegen hatten einen kleineren Perikaryondurchmesser. DRG-Neurone, die sich immunreaktiv für CGRP zeigten, wiesen sowohl kleine als auch große Perikaryondurchmesser auf (Abb. 16 a, b.). Vier der vorkommenden Subpopulationen wiesen durchschnittliche Perikaryondurchmesser von 19 bis 22 μm auf. Diese eher kleinen Somagrößen zeigten die Neurone der FB/ $\alpha 3$ /CGRP/NF68-, FB/ $\alpha 3$ /CGRP-, FB/CGRP- und der FB-positiven

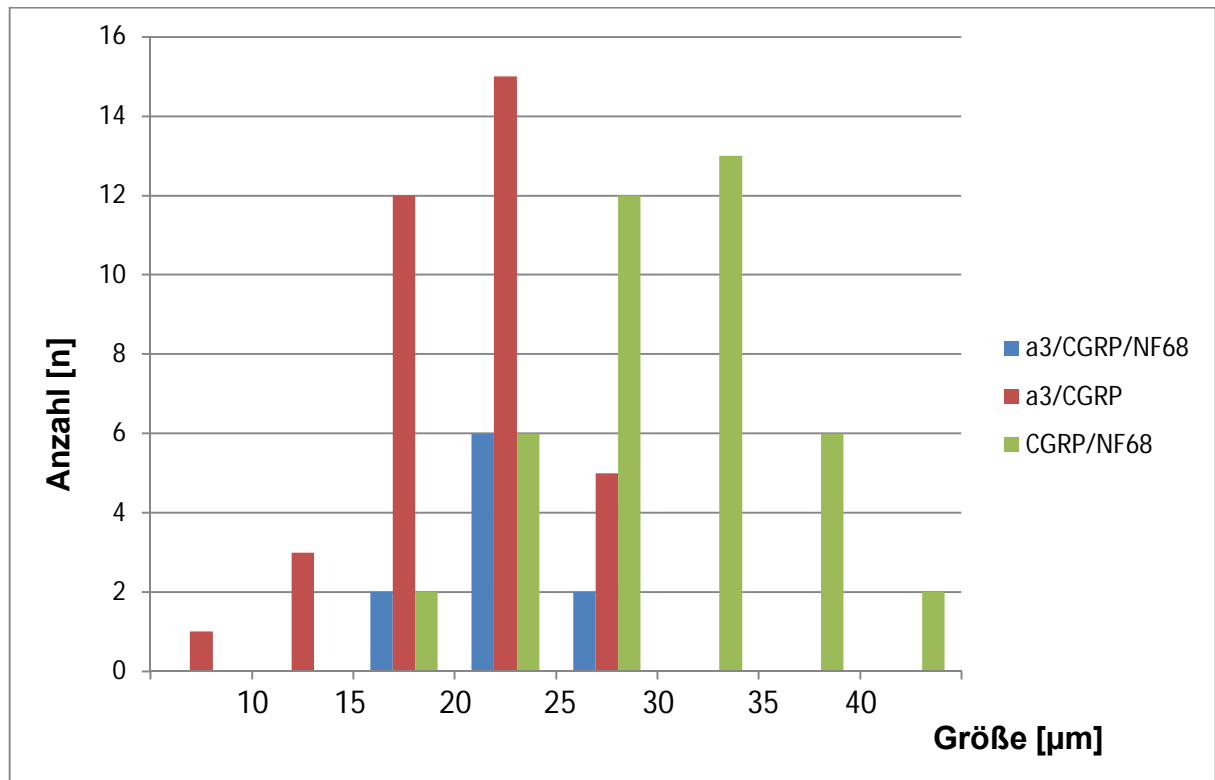
Subpopulation. Mit durchschnittlichen Perikaryondurchmessern von 29 bis 30 μm wiesen die FB/CGRP/NF68- und die FB/NF68-positive Subpopulation eher große Somagrößen auf. Die Subpopulation, die lediglich Fast Blue-positive Neurone aufwies, beinhaltete zwar ein Neuron, das $>40 \mu\text{m}$ groß war, ist jedoch durchschnittlich als Population mit kleiner Somagröße zu betrachten.

Zur Feststellung, ob die Größenverteilung der sechs Neuronsubpopulationen signifikant von der Normalverteilung abweicht, wurden sie dem Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest unterzogen. Hierbei wurde festgestellt, dass die Größenverteilung nicht signifikant von der Normalverteilung abweicht ($p = 0,905$). Daher wurde für die weitere statistische Auswertung eine Varianzanalyse mittels Post-Hoc-Test unter Bonferoni-Korrektur durchgeführt.

Die FB/CGRP/NF68-positive Subpopulation wies signifikant größere Perikaryondurchmesser auf als die restlichen Subpopulationen (Tab. 7), lediglich zur FB/NF68-positiven Subpopulation konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die FB/NF68-positive Subpopulation enthielt Neurone mit signifikant größeren Perikaryondurchmessern als die der drei Subpopulationen FB/ α 3/CGRP, FB/CGRP, und FB/ α 3/CGRP/NF68 (Tab. 7). Die Subpopulation, die sich lediglich Fast Blue-positiv zeigte, enthielt signifikant kleinere Neurone als die FB/CGRP/NF68-positive Subpopulation (Tab. 7). Die Größenunterschiede zu allen weiteren Subpopulationen waren nicht signifikant.

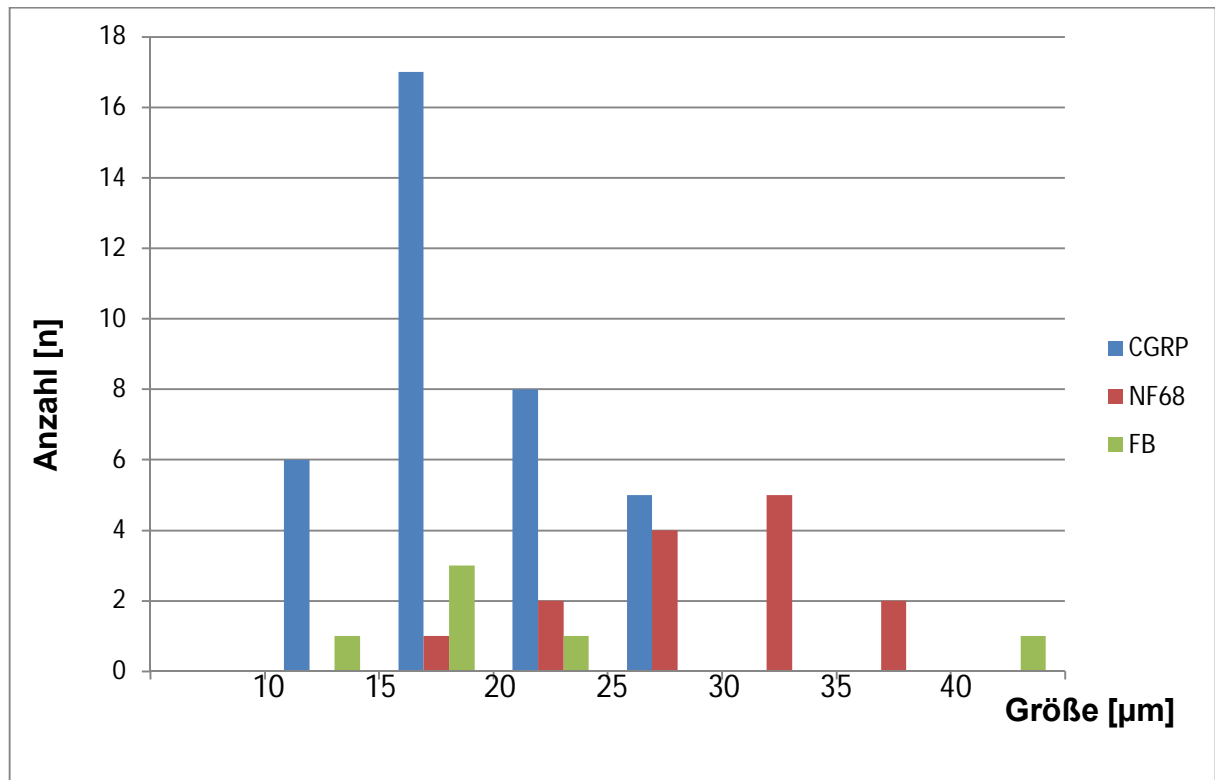
Getestete Subpopulationen		p-Wert
FB/CGRP/NF68	FB/ α 3/CGRP/NF68	0,001 (hochsignifikant)
FB/CGRP/NF68	FB/CGRP	0,000 (hochsignifikant)
FB/CGRP/NF68	FB/ α 3/CGRP	0,000 (hochsignifikant)
FB/CGRP/NF68	FB	0,018 (signifikant)
FB/NF68	FB/ α 3/CGRP	0,000 (hochsignifikant)
FB/NF68	FB/CGRP	0,000 (hochsignifikant)
FB/NF68	FB/ α 3/CGRP/NF68	0,007 (signifikant)

Tab. 7: Durch Varianzanalyse (Post-Hoc unter Bonferroni-Korrektur) ermittelte signifikante Unterschiede einzelner Subpopulationen bezüglich ihres Perikaryondurchmessers.



a)

Abb. 16 a: Subpopulationen Fast Blue-positiver DRG-Neurone und ihre Häufigkeit bezogen auf ihren Perikaryondurchmesser. Zur besseren Übersicht sind die sechs Subpopulationen auf zwei Diagrammen (Abb. 16 a und b) dargestellt.



b)

Abb. 16 b: Größenverteilung des Perikaryondurchmessers von Subpopulationen Fast Blue-positiver DRG-Neurone. Zur besseren Übersicht sind die sechs Subpopulationen auf zwei Diagrammen (Abb. 16 a und b) dargestellt.

5 Diskussion

5.1 Retrograde neuronale Markierung (kritische Betrachtung des Versuchsaufbaus)

Ziel des retrograden neuronalen Tracings war, wie in verschiedenen Vorläuferarbeiten beschrieben (Springall et al. 1987, Kummer et al. 1990, Dinh et al. 2001), die Markierung der Zellkörper der zu den unteren Atemwegen projizierenden Neuronen.

Bereits 1987 zeigten Springall et al. mittels retrogradem Tracing, dass Nervenfasern der Trachea und Lunge bei Ratten neben dem Ganglion jugulare und dem Ganglion nodosum auch aus DRGs stammen. Allerdings benutzten Springall et al. eine andere Technik als die hier angewendete; sie injizierten den Tracerfarbstoff True Blue perkutan in die linke und rechte Lunge (Springall et al. 1987), während der Tracerfarbstoff Fast Blue in der vorliegenden Arbeit mittels eines Zugangs über die Atemwege injiziert wurde. Die Injektionskanüle wurde über eine Inzision zwischen zwei Knorpelspangen im mittleren Drittel der Trachea in den rechten Hauptbronchus und soweit möglich in das Parenchym der rechten Lunge vorgeschoben. Diese Methode wurde schon in vorausgegangenen Arbeiten angewendet (Dinh et al. 2004, 2005, Radke 2007), die sich jedoch nicht mit der retrograden Markierung von DRG-Neuronen befassten. Vier Tage später wurden die Mäuse getötet und die Organe wurden entnommen. Der Tracerfarbstoff verteilte sich bei drei Mäusen in unterschiedlicher Intensität in Trachea und Lunge, bei einer Maus konnte der Tracerfarbstoff lediglich in der Trachea bis hin zur Bifurcatio tracheae nachgewiesen werden. Die Lokalisation des Tracers in der linken Lunge ist vermutlich durch eine Verbreitung durch Ziliar-, Husten- und Atembewegungen zu erklären. Eine ähnliche Tracerverteilung beschrieb auch Dinh (2001) nach Tracerapplikation in den rechten Hauptbronchus.

Die in dieser Arbeit angewendete Methode ist insofern kritisch zu betrachten, als dass in den entnommenen Rückenmarksegmenten (C1-C5) auf Höhe C1-C4 retrograd markierte Motoneurone gefunden wurden. Motoneurone aus dem Halsmark C1-C4 projizieren zur infrahyalen Muskulatur. Nach einer Markierung dieser Muskulatur lassen sich nach retrogradem axonalem Transport markierte DRG-Neurone (C1-C4) und markierte Motoneurone in der medialen Seite des Ventralhorns der grauen Substanz in den Rückenmarkssegmenten C1-C4 nachweisen (Gottschall et al. 1980). Es ist daher anzunehmen, dass es durch die Inzision der Trachea zum Austritt des Tracerfarbstoffs in die

infrahyale Muskulatur kam. Aufgrund dessen wurden die retrograd markierten Neurone der DRGs C1-C4 nicht weiter beachtet, da unter diesen auch Afferenzen aus der infrahyalen Muskulatur zu erwarten sind und diese sich nicht sicher von Atemwegsafferenzen abgrenzen ließen. Um diese Kontamination der infrahyalen Muskulatur zu verhindern, könnte man bei größeren Tieren die Läsion der Trachea mit einem Gewebekleber verschließen. In diesem speziellen Fall wurde allerdings davon abgesehen, da das sehr kleine Lumen der Mäusetrachea schnell verlegt sein könnte. Groth und Helbig injizierten den Tracerfarbstoff Dil bei sonst gleicher Methode in das linke Lungenparenchym von Ratten. Auch sie fanden bei allen Tieren retrograd markierte Motoneurone im RM, allerdings ventral im Segment C3. Dies wurde als ein Tracerübertritt in das Zwerchfell mit retrograder Markierung der in den N. phrenicus projizierenden Motoneurone interpretiert (Groth et al. 2006). Trotz möglicher Fehlerquellen ist der Versuchsaufbau in der vorliegenden Arbeit eine gute Möglichkeit, die Zellkörper der zur Lunge und den Atemwegen projizierenden Nervenfasern zu identifizieren. Da der Tracerfarbstoff weder makroskopisch noch mikroskopisch in anderen Organen entdeckt werden konnte und die zur infrahyalen Muskulatur projizierenden DRG-Neurone nicht ausgewertet wurden, handelt es sich bei den markierten DRG-Neuronen (C5-T5) mit großer Wahrscheinlichkeit nur um solche, die die Atemwege und Lunge innervieren.

5.2 Segmentale Verteilung der retrograd markierten DRG-Neurone

Übereinstimmend mit vorausgegangenen Arbeiten an verschiedenen Tiermodellen (Springall et al. 1987, Dey et al. 1990, Kummer et al. 1992, Oh et al. 2006, Groth et al. 2006) konnten in dieser Arbeit neben den sensorischen Vagusganglien (Ganglion nodosum und Ganglion jugulare) auch die zervikalen und thorakalen Spinalganglien als Quelle der sensorischen Innervation der unteren Atemwege identifiziert werden.

Die größte Anzahl retrograd markierter Neurone befanden sich in den zervikalen DRGs C5 sowie in den thorakalen DRGs T1 und T2. Auch in der Arbeit von Groth und Helbig zeichnete sich bei den DRGs T1 und T2 von Ratten ein deutlicher Peak ab. Nach Tracerinjektion in die linke Lunge fanden sie auf der linken Seite 51% der retrograd markierten Neurone in den DRGs T1 und T2 und 53% der retrograd markierten Neurone der rechten Seite ebenfalls in den DRGs T1 und T2 (Groth et al. 2006). Da in vorausgegangenen Arbeiten unterhalb T5 keine nennenswerten Markierungen entdeckt werden konnten, wurden in der vorliegenden Arbeit die DRGs nur bis T5 untersucht. Retrograd markierte Neurone konnten in der vorliegenden Arbeit bis in die DRGs T3 gefunden werden. In den DRGs T4 und T5 konnten

hier keine retrograden Markierungen festgestellt werden, während Oh et al. (2006) neben den DRGs T1 und T2 auch die DRGs T3 und T4 als Atemwege und Lunge innervierende DRGs beim Meerschweinchen beschreiben. Speziespezifische Unterschiede sowie unterschiedliche Applikationsweisen des Tracers könnten eine Erklärung für die teilweise abweichende segmentale Verteilung der retrograd markierten DRG-Neurone von Maus, Meerschweinchen und Ratte liefern.

Die Gesamtzahl der retrograd markierten Neurone in den DRGs (C5–T5) der vorliegenden Arbeit betrug 143 bei vier Mäusen. Groth und Helbig konnten bei ihren Untersuchungen an Ratten (n=4) eine weitaus höhere Anzahl nachweisen; sie fanden in den DRGs C4–T10 2637 retrograd markierte Neurone. Neben speziespezifischen Unterschieden können auch methodische Unterschiede, wie eine unterschiedliche Verteilung des Tracers in den Atemwegen oder anderen Organen, unterschiedlich dicke Schnitte oder verschiedene Zeitabstände zwischen dem Tracing und der Organentnahme Gründe für die unterschiedliche Anzahl retrograd markierter DRG-Neurone liefern. Allerdings steht die Gesamtzahl retrograd markierter DRG-Neurone nicht im Mittelpunkt dieser Arbeit. Das Augenmerk liegt auf dem prozentualen Anteil $\alpha 3$ -GFP-positiver retrograd markierter DRG-Neurone und deren neurochemischer Charakteristika.

Obwohl der Tracer Fast Blue in den rechten Hauptbronchus injiziert wurde, konnten markierte DRG-Neurone in rechtsseitigen sowie linksseitigen DRGs gefunden werden. 52% der 143 retrograd markierten DRG-Neurone aus 4 Mäusen waren in der vorliegenden Arbeit der rechten Körperhälfte und 48% der linken Körperhälfte zugehörig. Während die Seitenverteilung der retrograd markierten DRG-Neurone bei den Mäusen 2 und 3 nahezu ausgeglichen war, zeigten sich bei den Mäusen 1 und 4 große Unterschiede. 74% der retrograd markierten Neurone fanden sich bei Maus 1 in den rechtsseitigen DRGs. Demgegenüber konnten bei der vierten Maus 70% der retrograd markierten Neurone in den linksseitigen DRGs gefunden werden. Eine Erklärung hierfür lässt sich evtl. aus der Tracerverteilung am Applikationsort ableiten. Bei Maus 1, deren retrograd markierte Neurone vorwiegend rechtsseitig zu finden waren, verteilte sich der Tracerfarbstoff in der gesamten Lunge. In der Lunge der Maus 4 (vorwiegend retrograd markierte DRGs links) konnte kein Tracer gefunden werden. Bei den Mäusen 2 und 3 konnte der Tracerfarbstoff in der Trachea und in Teilen der Lunge gefunden werden.

Kummer et al. beschrieben an Meerschweinchen wie zuvor schon Springall et al. an Ratten neben dem JNC auch die vorderen thorakalen DRGs als einen Ursprung der sensorischen

Innervation der Atemwege. Es wird allerdings darauf hingewiesen, dass diese Markierung auch Folge von Diffusion des Farbstoffs zur Pleura und damit ein Artefakt sein könnte (Springall et al. 1987, Kummer et al. 1992). In der vorliegenden Arbeit konnte der Tracerfarbstoff allerdings nicht in benachbarten Organen oder Gewebe gefunden werden, was eine Markierung von Pleuraafferenzen unwahrscheinlich macht.

Nach Tracerinjektion in die Tracheawand zeigten sich bei Kummer et al. (1992) keine regelmäßigen Markierungen von DRG-Neuronen, sehr spärliche Ergebnisse lieferte dieses Verfahren auch bei Springall et al. (1987). Mit der vorliegenden Arbeit vergleichbare Ergebnisse erhielten sie nach Tracerapplikation ins Trachealumen, allerdings kamen Kummer et al. zu dem Schluss, dass die sensorische Innervation der Lunge hauptsächlich vagalen Ursprungs ist.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Hauptlokalisation der zur Lunge und zu den unteren Atemwegen projizierenden DRG-Neurone in den DRGs T1 und T2 zu finden ist.

5.3 Perikaryondurchmesser der retrograd markierten DRG-Neurone

Die Zellkörper der retrograd markierten DRG-Neurone wurden vermessen und ihre Immunreaktivität für NF68 wurde getestet. Beide Charakteristika, sowohl der Perikaryondurchmesser, als auch der NF-Gehalt, geben Aufschluss über die Leitungsgeschwindigkeit und den Myelinisierungsgrad der Neurone (Lawson et Waddell 1991). Die Neurone wurden in drei verschiedene Neuronpopulationen unterteilt, die aller Wahrscheinlichkeit nach A α / β -, A δ - oder C-Fasern entsenden. Die Einteilungskriterien sind in Tabelle 8 dargestellt. Eine strikte Unterteilung in drei Neuronpopulationen war durch die sich überschneidenden Perikaryondurchmesser allerdings schwierig, weshalb voraussichtlich einige Fasern zwischen A α / β und A δ falsch zugeordnet wurden. Ab einem Perikaryondurchmesser von über 35 μ m und Immunreaktivität für NF68 wurden die Neurone den A α / β -Fasern zugeordnet, während die NF68-positiven Neurone unter 35 μ m Durchmesser den A δ -Fasern zugeordnet wurden. Die Neurone, die keine Immunreaktivität für NF68 aufwiesen und deren Perikaryondurchmesser unter 35 μ m betrug, wurden den C-Fasern zugeteilt. Die Immunreaktivität für NF68 spiegelt den Myelinisierungsgrad wider. Die Einteilung in NF68-positive bzw. NF68-negative DRG-Neurone fiel bei Neuronen, welche nur sehr geringe Immunreaktivität für NF68 aufwiesen, teilweise schwierig aus. Daher könnte

es zu falschen Zuordnungen zwischen den A δ und den C-Fasern gekommen sein. Insgesamt konnten 142 von 143 Neuronen einer Faserqualität zugeordnet werden. Ein Neuron konnte nicht zugeteilt werden, da es keine Immunreaktivität für NF68 zeigte, aber einen Perikaryondurchmesser von über 35 μm erreichte. Der durchschnittliche Perikaryondurchmesser der retrograd markierten DRG-Neurone betrug 23,7 μm . Die Mehrheit der Neurone hatte eine Größe zwischen 15 und 25 μm , nur wenige waren kleiner als 10 μm oder größer als 40 μm . Die Mehrzahl der spinalen Atemwegsafferenzen (54%) entsendet demnach C-Fasern (Tab. 8). Mit 39% entsendet auch ein beträchtlicher Anteil der DRG-Neurone A δ -Fasern. Nur 7% der DRG-Neurone entsenden A α / β -Fasern. Die A α -Fasern übernehmen propriozeptive Aufgaben und die A β -Fasern reagieren auf Druck und Berührungsreize (Julius und Basbaum 2001).

Die Mehrheit der zur Lunge projizierenden DRG-Neurone konnten somit den A δ - und C-Fasern zugeordnet werden (Tab. 8). Die C-Fasern nehmen potenziell gewebeschädigende Reize wahr und reagieren auf Volumenzunahme in der Lunge. Auch A δ -Fasern können nozizeptive Eigenschaften besitzen (Koltzenburg et al. 1995, 1999, Snider und Mc Mahon 1998). Die leicht myelinisierten und damit schneller leitenden A δ -Fasern vermitteln den ersten, oft als „spitz oder stechend“ beschriebenen Schmerz, der präzise zu lokalisieren ist und den Fluchtreflex auslöst. Der zweite Schmerz wird über C-Fasern vermittelt. Da diese unmyelinisiert und daher langsam leitend sind, wird dieser Schmerz später wahrgenommen. Er ist extensiv, wird oft als „brennend“ beschrieben und kann nur ungenau lokalisiert werden (Raja et al. 1999, Basbaum und Jessel 2000). Viele C-Fasern und eine kleine Population der A δ -Fasern sind polymodale Nozizeptoren, die durch Hitze, mechanische Reize und chemische Substanzen aktiviert werden. Viele Nozizeptoren werden auch von Protonen aktiviert, dafür ist allerdings eine hohe Konzentration ($\text{pH} < 6,0$) notwendig. Sie wird z.B. bei einer Entzündung oder Ischämie erreicht. Dies lässt die Vermutung zu, dass lokale Gewebeansäuerung maßgeblich an der Schmerzentstehung beteiligt ist. (Steen und Reeh 1993, 1995, Reeh und Steen 1996, Kress und Zeilhofer 1999). Die Lunge ist allerdings nicht besonders schmerzempfindlich, so dass die hohe gefundene Anzahl potenzieller Nozizeptoren paradox erscheinen mag. Hierbei ist aber zu berücksichtigen, dass die Empfindung „Schmerz“ erst das Ergebnis zentralnervöser Verarbeitung ist. Ein „nozizeptives Neuron“ hingegen dient zunächst der Wahrnehmung eines gewebeschädigenden Reizes. Die Reaktion auf dessen

Stimulierung kann auch in der Einleitung lokaler Schutzreflexe bestehen, ohne dass dies als Schmerz wahrgenommen wird.

Faserqualität	Perikaryondurchmesser [µm]	Neurofilament (NF)	Anzahl	%
Aα/β	>35	positiv	10	7
Aδ	<35	positiv	55	39
C	<35	negativ	77	54
			142	100

Tab. 8: Einteilung der DRG-Neurone bzgl. ihres Perikaryondurchmessers und ihrer Immunreaktivität für NF68 (Myelinisierungsgrad). Die Gesamtzahl der Neurone beträgt 142 aus 4 Tieren. Ein Neuron konnte keiner Faserqualität zugeordnet werden, da es nicht in das vorgegebene Schema passte.

5.4 Neurochemische Charakteristika Fast Blue-positiver DRG-Neurone

5.4.1 Myelinisierte Nervenfasern

5.4.1.1 Häufigkeit von NF68 in zur Lunge projizierenden Spinalganglienneuronen

In der vorliegenden Arbeit wiesen 46% der mit Fast Blue retrograd markierten DRG-Neurone Immunreaktivität für NF68 auf. Schliecker beschreibt 60,4% der retrograd markierten Neurone aus den JNCs als NF68-positiv (Schliecker 2009). In ihrer Arbeit am Meerschweinchen konnten Oh et al. (2006) lediglich in 14% der mit Dil markierten DRG-Neurone eine Immunreaktivität für NF nachweisen. Allerdings instillierten sie den Tracer Dil stets in das Lumen der Trachea, nicht wie in der vorliegenden Arbeit auch teilweise in das Lungengewebe. Bei genauerer Betrachtung der Ergebnisse zeigt sich auch in der vorliegenden Arbeit, dass die Maus 4, bei der kein Tracerfarbstoff in der Lunge, sondern nur in der Trachea gefunden wurde, gegenüber den Mäusen, bei denen auch in der Lunge Tracer nachgewiesen werden konnte, mit 33% den geringsten Anteil an NF-positiven retrograd markierten DRG-Neuronen besitzt. Dieser Wert ist allerdings noch immer deutlich höher als der, den Oh et al. in ihrer Arbeit am Meerschweinchen erhoben. Möglicherweise gibt es in der Lunge mehr Nervenendigungen von NF-immunreaktiven DRG-Neuronen als in der Trachea, d.h. mehr schnell leitende myelinisierte Nervenfasern. Auch speziesspezifische Unterschiede zwischen Maus und Meerschweinchen sind denkbar.

Eine Subpopulation, die sich $\alpha 3$ - und CGRP-negativ, aber NF68-positiv zeigte, kam in der vorliegenden Arbeit mit einem Anteil von 8% der retrograd markierten DRG-Neurone vor. Diese Subpopulation machte in der Arbeit von Schliecker 55% der retrograd markierten JNC-Neurone aus (Schliecker 2009). Unter den JNC-Neuronen machten die myelinisierten Neurone mit 60% den größten Anteil aus (Schliecker 2009), während in der vorliegenden Arbeit die unmyelinisierten, also NF-negativen DRG-Neurone mit 54% den größten Anteil ausmachten. Daraus ist zu schließen, dass vagale und spinale Atemwegs-/Lungenafferenzen sich zumindest in der relativen Häufigkeit, wenn nicht auch qualitativ, funktionell definierter Neuronpopulationen unterscheiden.

5.4.1.2 $\alpha 3$ /CGRP/NF68-positive Neurone

8% der mit Fast Blue retrograd markierten DRG-Neurone ließen sich der $\alpha 3$ /CGRP/NF68-positiven Subpopulation zuordnen. Kein Neuron dieser Subpopulation erreichte einen Perikaryondurchmesser von $>30\text{ }\mu\text{m}$. Ihr durchschnittlicher Perikaryondurchmesser betrug $22\text{ }\mu\text{m}$. Diese Gruppe machte laut Schliecker (2009) bei den retrograd markierten JNC-Neuronen lediglich 1,8% aus. Die Funktion der Nervenfasern dieser Subpopulation ist allerdings noch unklar. Einerseits ließe sich die Subpopulation aufgrund ihrer Größe von $<35\text{ }\mu\text{m}$ und ihrer Immunreaktivität für NF68 den myelinisierten A δ -Fasern zuordnen, andererseits ist nicht klar, wie die Expression des nAChRs die Qualität dieser Nervenfasern beeinflusst. Gegenüber der Subpopulation, die Immunreaktivität für CGRP und NF68, aber nicht für die $\alpha 3$ nAChR-Untereinheit aufweist, fällt der Größenunterschied ins Auge. Der durchschnittliche Perikaryondurchmesser dieser Subpopulation beträgt $30\text{ }\mu\text{m}$ und mehrere einzelne Neurone erreichen Perikaryondurchmesser von $>35\text{ }\mu\text{m}$. Der deutliche Größenunterschied zeigt, dass die Subpopulation der $\alpha 3$ /CGRP/NF68-positiven Nervenfasern als eigene Gruppe gesehen werden kann.

5.4.1.3 CGRP/NF68-positive Neurone

Eine Neuronsubpopulation, die Immunreaktivität für CGRP und NF68 zeigt, wurde bisher auf sensorischen Atemwegsafferenzen nicht nachgewiesen. CGRP wurde in früheren Studien am Meerschweinchen in unmyelinisierten (NF-negativen) Nervenfasern mit kleinen Perikaryondurchmessern nachgewiesen (Riccio et al. 1996). Neurofilamente dagegen bestimmen den axonalen Durchmesser, sie sind besonders häufig in großen, schnell leitenden Nervenfasern zu finden (Ohara et al. 1993, Sakaguchi et al. 1993, Zhao et al. 1994). In der vorliegenden Arbeit war diese Subpopulation mit 30% die größte der mit Fast Blue retrograd markierten DRG-Neurone. Ihr durchschnittlicher Perikaryondurchmesser betrug $30\text{ }\mu\text{m}$. Eine vergleichbare Durchschnittsgröße erreichte mit $29\text{ }\mu\text{m}$ lediglich die Subpopulation, die nur Immunreaktivität für NF68 aufwies. Wie bereits erwähnt ist es üblich, dass NF68-positive, also Neurone mit myelinisierten Nervenfasern, große Perikaryondurchmesser aufweisen. Allerdings wiesen die beiden genannten Subpopulationen deutlich größere Perikaryondurchmesser auf als die CGRP- und NF68-immunreaktive Subpopulation, die sich ebenfalls $\alpha 3$ -positiv zeigte. Oh et al. (2006) fanden retrograd markierte thorakale DRG-Neurone 14 Tage nachdem sie den Tracer Dil ins Lumen der Trachea von Meerschweinchen

platzierten. Sie testeten die retrograd markierten Neurone auf ihre Immunreaktivität gegenüber NF sowie SP. SP ist ein Neuropeptid, dass in den Atemwegsneuronen gemeinsam mit CGRP exprimiert wird (Kummer et al. 1992). Ihre Ergebnisse zeigten keine DRG-Neurone, die Immunreaktivität für NF sowie für SP aufwiesen. Lediglich 14% der Neurone zeigten sich NF-positiv, während 72% SP-Immunreaktivität aufwiesen. Lawson et al. (1993) untersuchten sensorische lumbale DRG-Neurone aus Ratten auf ihre Immunreaktivität gegenüber CGRP und NF200. Ihre Ergebnisse zeigten, dass 28% aller NF-immunreaktiven DRG-Neurone ebenfalls Immunreaktivität für CGRP besaßen. Diese Neurone hatten wie in der vorliegenden Arbeit kleine bis große Perikaryondurchmesser. Ein Drittel aller A-Fasern ihrer Studie enthielt CGRP. In der vorliegenden Arbeit wurden die Neurone anhand ihres Perikaryondurchmessers und ihres Myelinisierungsgrades (Tabelle 8) verschiedenen Faserqualitäten zugeordnet. Dabei zeigte sich, dass 78% aller putativen A-Fasern CGRP-positiv waren. Letztlich stellt sich die Frage, unter welchen Umständen es zu einer Ko-Expression von NF und CGRP kommen kann. Die Studie von Myers et al. (2002) zeigte am Modell des Meerschweinchens, dass eine allergische Entzündung der Atemwege zu phänotypischen Veränderungen der myelinisierten, also NF-positiven Nervenfasern führt. Über 30% der myelinisierten Nervenfasern exprimierten unter der Entzündung CGRP und SP, während es bei den Kontrolltieren <1% waren. Die Wahrscheinlichkeit, dass die Subpopulation der CGRP/NF68-positiven DRG-Neurone das Produkt einer Entzündung der Atemwege ist, die durch die Tracerinjektion hervorgerufen wurde, ist in der vorliegenden Arbeit allerdings sehr gering. Klinisch wie auch histologisch konnten bei den Mäusen keine Entzündungsanzeichen festgestellt werden.

5.4.2 Unmyelinisierte Nervenfasern (C-Fasern)

Als C-Fasern werden sensorische Nervenfasern bezeichnet, deren Axone unmyelinisiert sind und die daher sehr geringe Leitungsgeschwindigkeiten (< 1m/s) aufweisen (Coleridge et Coleridge 1984). Der Großteil der C-Fasern besitzt nozizeptive Eigenschaften (Koltzenburg 1995, Koltzenburg 1999, Snider et McMahon 1998) und entspringt kleinen bis mittelgroßen Zellkörpern (Wood et al. 1988, Kress et Reeh 1996). C-Fasern lassen sich in Capsaicin-sensitive- und Capsaicin-insensitive-Fasern unterteilen (Kollarik et al. 2003). Volumenzunahme in der Lunge stimuliert die C-Fasern und führt zu Bradykardie, Hypotension und Apnoe, gefolgt von flacher, frequenter Atmung. Auch Bronchokonstriktion und erhöhte Schleimproduktion sind Ergebnisse der Aktivierung von C-Fasern (Coleridge et

Coleridge 1994, Widdicombe et Wells 1994). Polymodale Nozizeptoren lassen sich in zwei Subpopulationen, die peptidergen und die nicht-peptidergen C-Fasern, unterteilen (Silverman et Krüger 1990). Beide verwenden Glutamat als exzitatorischen Neurotransmitter und benötigen in der Embryonalzeit bzw. mit Beginn der Differenzierung des sich entwickelnden Nervensystems die Versorgung mit Nerve Growth Factor (NGF) (Silos Santiago et al. 1995, Koltzenburg 1995, Snider et McMahon 1998). In der frühen postnatalen Phase verändert sich allerdings das Expressionsmuster einer der beiden Subpopulationen und die Neurone benötigen statt NGF von nun an GDNF (glial cell derived neurotrophic factor) zum Überleben und zur Aufrechterhaltung ihres Phänotyps. Diese Subpopulation bildet die Gruppe der nicht-peptidergen C-Fasern (Molliver 1997, Benett 1998). Die Änderung des Expressionsmusters geht mit der Präsentation eines IB₄-bindenden Glykokonjugates an der Zelloberfläche einher. Die nicht-peptidergen C-Fasern lassen sich daher über eine histochemische Markierung mit dem Lektin IB₄ darstellen. Die peptidergen C-Fasern exprimieren die Neuropeptide Substanz P und CGRP. Diesen peptidergen Nervenfasern wird bei der Entstehung der neurogenen Entzündung sowie bei der sogenannten zentralen Sensibilisierung eine wichtige Bedeutung zugeschrieben (Woolf und Salter 2001). Nicht nur das unterschiedliche Expressionsprofil und die Abhängigkeit von verschiedenen Neurotrophen unterscheiden die beiden C-Faser Populationen voneinander, es bestehen auch Unterschiede in ihren elektrophysiologischen Eigenschaften und hinsichtlich des Terminationsgebietes ihrer zentralen Ausläufer. Es wird daher vermutet, dass beide Populationen unterschiedliche Aspekte nozizeptiver Informationen in das ZNS übertragen (Snider et McMahon 1998, Stucky et Lewin 1999).

In der vorliegenden Arbeit wurden ebenfalls unmyelinisierte Neurone gefunden. Mit 54% aller retrograd markierten DRG-Neurone war ihr Anteil größer als der myelinisierter Neurone. Mit 6% zeigte sich nur ein sehr geringer Anteil dieser Neurone CGRP-negativ. 94% der unmyelinisierten retrograd markierten DRG-Neurone zeigten sich CGRP-positiv.

5.4.2.1 Peptiderge C-Fasern

5.4.2.1.1 α 3/CGRP-positive Neurone

Mit 25% machte diese Subpopulation in der vorliegenden Arbeit einen relativ großen Anteil der mit Fast Blue retrograd markierten DRG-Neurone aus. 78% aller α 3-positiven retrograd markierten Neurone konnten in dieser Subpopulation verzeichnet werden. Schliecker beschrieb lediglich einem Anteil von 3,5% aller retrograd markierten JNC-Neurone in dieser Subpopulation (Schliecker 2009). Der durchschnittliche Perikaryondurchmesser war mit

20 μm relativ klein, kein Neuron dieser Subpopulation erreichte eine Größe über 27 μm . Man kann vermuten, dass es sich bei dieser Subpopulation um $\alpha 3$ -exprimierende peptiderge C-Fasern handelt. Andere Ergebnisse erhielten Dehkordi et al. (2009) aus der Ratte, als sie mittels immunhistologischen Untersuchungen die nAChR-Expression sowie die Immunreaktivität für SP an ausgewählten intrapulmonalen sensorischen Nervenendigungen untersuchten. Keine der von ihnen untersuchten nAChR-Untereinheiten $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 7$ und $\beta 2$ wurde durch SP-immunreaktive C-Fasern exprimiert. SP wird im Meerschweinchen stets in den C-Faser-Neuronen der Atemwege exprimiert, die ebenfalls CGRP exprimieren (Kummer et al. 1992). In ihrer Studie bestätigten Dehkordi et al. zwar das Vorkommen von nAChR-Untereinheiten im Lungengewebe von Ratten auf mRNA- und Protein-Level, für die Untersuchungen der C-Fasern auf Immunreaktivität gegenüber SP und verschiedenen nAChR-Untereinheiten nutzten sie jedoch, anders als in der vorliegenden Arbeit, immunhistochemische Verfahren. Es besteht daher die Möglichkeit, dass Dehkordi et al. (2009) aufgrund methodischer Probleme bei der Arbeit mit nAChR-Antikörpern falsche Ergebnisse erzielten. Eine kritische Betrachtung der immunhistochemischen Charakterisierung der Lunge mit Hilfe von Antikörpern gegen Untereinheiten des nAChR ist durchaus angebracht. Die Spezifität zahlreicher Antikörper gegen die $\alpha 3$ -, $\alpha 4$ -, $\alpha 7$ -, $\beta 2$ - und $\beta 4$ -Untereinheiten des nAChR wurde von Herber und Moser am Gehirn der Maus getestet (Herber et al. 2004, Moser et al. 2007). Sie stellten beim Vergleich der Wildtyp- und der Knockout-Mäuse der entsprechenden Rezeptoruntereinheiten im Western Blot und in der Immunhistochemie an Gefrier-, Vibratom- und Paraffin-Schnitten fest, dass diese Antikörper gegen eine bestimmte nAChR-Untereinheit falsch positive Ergebnisse liefern. Bei der Verwendung dieser Antikörper sind daher unspezifische Reaktionen nicht auszuschließen. Weiterhin sind auch speziesspezifische Unterschiede als Ursache der zwischen den von Dehkordi et al. an Ratten und in dieser Arbeit an Mäusen erhobenen Ergebnisse denkbar. Lang et al. (2003) berichteten von elektrophysiologischen Studien, die auf eine funktionelle Expression von nikotinergen Rezeptoren aus $\alpha 3$ -, $\alpha 5$ - und $\beta 4$ -Untereinheiten in humanen C-Fasern hindeuteten.

Von allen sensorischen Strukturen werden vor allem die C-Fasern und RARs von Nikotin stimuliert (Lee et al. 2007). Nikotin wirkt u.a. an nAChRs in verschiedenen Bereichen des Bronchialbaums und löst damit Atemwegsirritationen, Schleimsekretion und Bronchokonstriktion aus (Rose et al. 1984, 1985). Diese Effekte können neben lokalen intrapulmonalen Mechanismen auch durch die Stimulation sensorischer Endigungen in den

Atemwegen und der Lunge ausgelöst werden (Xu et al. 2007, Lee et al. 2007). Viele Studien testeten bereits, welche Auswirkungen das Einatmen von Zigarettenrauch auf die Atemwege bzw. den Organismus hat. Kwong et al. (2001) setzten Meerschweinchen chronisch Zigarettenrauch aus. 14-17 Tage lang wurden die Tiere zweimal 20 min täglich dem Rauch ausgesetzt. Nach dieser Belastung war die Expression von SP und CGRP in afferenten Nervenfasern signifikant höher als in den Kontrollgruppen, die dem Zigarettenrauch nicht ausgesetzt waren. Elektrophysiologische Studien zeigten, dass C-Fasern durch Nikotin stimulierbar sind und dass diese Stimulation durch den nAChR-Antagonisten Hexamethonium gehemmt werden kann (Lee et al. 1989). Wahrscheinlich gehörten diese C-Fasern zu der hier beschriebenen Subpopulation.

5.4.2.1.2 CGRP-positive Neurone

Diese Subpopulation, die Immunreaktivität für CGRP zeigt, jedoch für NF68 und $\alpha 3$ negativ ist, bildet mit 25% einen relativ großen Anteil der mit Fast Blue retrograd markierten DRG-Neurone. Mit einem durchschnittlichen Perikaryondurchmesser von 19 μm hat diese Subpopulation die kleinsten Nervenzellkörper, allerdings erreichen auch hier einzelne Neurone einen Durchmesser von bis zu 29 μm . Neben vagalen sensorischen Nervenfasern aus dem Ganglion nodosum innervieren SP-/CGRP-immunreaktive Nervenfasern aus den DRGs pulmonale NEBs, die überall im Epithel der intrapulmonalen Atemwege zerstreut sind (Cadieux et al. 1986, Springall 1987, Brouns 2003, Adriaensen 2003). Brouns et al. (2003) überprüften verschiedene Populationen sensorischer Nervenfasern, die selektiv pulmonale NEBs in Rattenlungen kontaktierten. Aus dem Ganglion nodosum stammend fanden sie myelinisierte Nervenfasern, die ihre Myelinhülle kurz vor ihrer intraepithelialen Verzweigung verlieren. Diese Fasern zeigten sich Calbindin D28k- und P2X₃-immunreaktiv. Durch Capsaicin wurde diese vagale sensorische Komponente der NEB-Innervation allerdings nicht beeinflusst. Ebenfalls die pulmonalen NEBs innervierend, fanden sie unmyelinisierte nonvagale Nervenfasern, die Immunreaktivität für SP und CGRP aufwiesen und empfindlich auf Capsaicin reagierten. Der Ursprung dieser Fasern liegt in den DRGs. Die beiden Nervenfaserp Populationen waren durch ihre unterschiedlichen Charakteristika klar voneinander zu unterscheiden. In ihren Auswertungen zeigten Brouns et al., dass 50% der gezählten NEBs (aus Lungen gesunder, adulter Ratten) von CGRP-positiven Nervenfasern selektiv kontaktiert werden. Nach Bearbeitung dieser Fasern mit Capsaicin nahm die Anzahl der CGRP-immunreaktiven Nervenfasern signifikant auf 5% ab. Brouns et al. waren sich

sicher, dass diese intrapulmonalen Nervenfasern, die Immunreaktivität für CGRP aufwiesen, von vagalen Fasern zu unterscheiden sind und ihren Ursprung in den DRGs haben. Möglicherweise ist der Anteil an CGRP-positiven Nervenfasern in der vorliegenden Arbeit so groß, da es sich zum Großteil um peptiderge C-Fasern handeln könnte, die die pulmonalen NEBs innervieren. Mit 25% ist der Anteil dieser Population in der vorliegenden Arbeit deutlich größer als der, den Schliecker (2009) nach retrogradem Tracing der Atemwege und Lunge im JNC feststellen konnten (7%).

5.4.2.2 Nicht-peptiderge C-Fasern

5.4.2.2.1 $\alpha 3$ /CGRP/NF68-negative Neurone

Ein geringer Anteil von 3% der mit Fast Blue retrograd markierten Neurone zeigte weder für CGRP noch für NF68 Immunreaktivität. Plato et al. (2005) bestätigten in der Ratte das Vorkommen dieser Subpopulation und ordneten diese Gruppe den nicht-peptidergen unmyelinisierten C-Fasern zu. Vermutlich handelt es sich bei der $\alpha 3$ /CGRP/NF68-negativen Subpopulation in der vorliegenden Arbeit ebenfalls um nicht-peptidergen C-Fasern. Plato et al. verglichen erstmals direkt zwischen pulmonalen vagalen und spinalen Afferenzen der Ratte. Ihr besonderes Augenmerk galt der Somagröße, der Bindung von IB₄ und der Immunreaktivität für CGRP. Nicht peptiderge C-Fasern lassen sich über eine histochemische Färbung mit IB₄ verfolgen. Eine Population von IB₄-positiven CGRP-negativen DRG-Neuronen kam in Platos Studie mit einem Anteil von 5% vor. 3% der JNC-Neurone ließen sich ebenfalls dieser Population zuordnen. Im Bezug auf die DRG-Neurone sind diese Ergebnisse denen der vorliegenden Arbeit sehr ähnlich. Jedoch bestand auch in der vorliegenden Arbeit durch die Studie von Schliecker (2009) der direkte Vergleich zu pulmonalen vagalen Afferenzen (JNC-Neuronen) der Maus. Dabei fiel auf, dass der Anteil CGRP- und NF68-negativer JNC-Neurone mit 29% deutlich höher war als in der Studie von Plato et al. (2005). Dieser deutliche Unterschied ist möglicherweise durch den Speziesunterschied bedingt. Mit einem durchschnittlichen Perikaryondurchmesser von 22 μ m wichen die Neurone dieser Subpopulation aus der vorliegenden Arbeit von den Charakteristika der C-Fasern ab, die eher kleine Zellkörper aufweisen.

5.4.3 Die nAChR-Untereinheit $\alpha 3$ in zur Lunge projizierenden Spinalganglienneuronen

Über Untersuchungen von $\alpha 3$ -nAChR exprimierenden DRG-Neuronen der Maus, die die Lunge innervieren, wurden zuvor nicht berichtet. Allerdings wiesen Boyd et al. bereits 1991 $\alpha 3$ -Untereinheiten in DRG-Neuronen von Hühnerembryonen nach. Genzen et al. entdeckten 2001 mittels RT-PCR-Technik das Vorhandensein von nAChR-Untereinheiten $\alpha 2$ – $\alpha 7$ und $\beta 2$ – $\beta 4$ in DRG aus Ratten. Dehkordi et al. untersuchten 2009 intrapulmonales Gewebe auf das Vorkommen von nAChR und fanden Immunreaktion für $\alpha 2$ -, $\alpha 3$ -, $\alpha 4$ -, $\alpha 5$ -, $\alpha 7$ - und $\beta 2$ -Untereinheiten in allen intrapulmonalen Atemwegsbereichen, mit den bereits beschriebenen Einschränkungen in der Spezifität des immunhistochemischen Nachweises von nAChR-Untereinheiten. Experimente an $\alpha 3$ -nAChR-knockout Mäusen weisen auf die Bedeutsamkeit dieser nAChR-Untereinheit hin. Diese Tiere überleben zwar die Geburt, sterben aber in den meisten Fällen schon in den ersten Lebenstagen oder kurz nach dem Absetzen vom Muttertier. Ihr Wachstum ist stark beeinträchtigt, die Blase stark vergrößert, mit einer Neigung zu Blaseninfektionen und Blasensteinen. Außerdem kann bei diesen Mäusen eine Mydriasis festgestellt werden (Xu et al. 1999).

Die vorliegende Arbeit liefert die ersten Beweise für die Expression von nAChRs der $\alpha 3$ -Untereinheit auf spinalen sensorischen Atemwegsafferenzen. 33% der retrograd markierten DRG-Neurone, die die Atemwege und Lunge innervieren, konnten hier als $\alpha 3$ -exprimierende DRG-Neurone identifiziert werden. In der Arbeit von Schliecker (2009) beträgt die Häufigkeit von $\alpha 3$ -positiven retrograd markierten Neuronen aus dem JNC 7,4%. Sowohl die vagalen (Schliecker 2009) als auch die spinalen $\alpha 3$ -exprimierenden afferenten Neurone sind in eine zusätzlich CGRP-positive und eine CGRP/NF68-positive Population zu untergliedern. Die quantitativen Unterschiede zwischen spinalen und vagalen $\alpha 3$ -exprimierenden Afferenzen betreffen beide Populationen. Hierbei zeigt sich erneut, dass sich spinale und vagale Atemwegs-/Lungenafferenzen in ihrer funktionellen Zusammensetzung unterscheiden. Eine über die $\alpha 3$ -Untereinheit vermittelte Erregung sensorischer Fasern spielt daher vornehmlich bei spinalen Afferenzen eine Rolle und betrifft sowohl eine nicht-myelinisierte (C-Fasern) als auch eine myelinisierte ($A\delta$ -Fasern) Population, soweit sich dies aus den Merkmalen NF68-Expression und Perikaryondurchmesser schließen lässt.

5.4.4 Häufigkeit von CGRP in zur Lunge projizierenden Spinalganglienneuronen

Springall et al. zeigten bereits 1987 durch retrogrades Tracing an Ratten, dass CGRP-immunreaktive Nervenfasern der Trachea und Lunge aus vagalen Ganglien und aus DRGs stammen.

Die retrograd markierten CGRP-positiven DRG-Neurone kamen in der vorliegenden Arbeit in einer Häufigkeit von 86% bzw. 123 von 143 Neuronen vor. Ihr Perikaryondurchmesser wies sowohl kleine als auch große Neurone auf. Die Betrachtung der vorkommenden Subpopulationen zeigt, dass die nAChR-Untereinheit $\alpha 3$ immer nur in Kombination mit CGRP vorkam. CGRP kam allerdings auch in $\alpha 3$ -negativen Subpopulationen vor. Am häufigsten war CGRP in der Kombination mit NF68 (30%) zu finden, aber auch in der Kombination mit der $\alpha 3$ -Untereinheit oder allein kam CGRP mit je 25% der retrograd markierten Neurone relativ häufig vor. Bei Schliecker (2009) war die relative Häufigkeit von CGRP-positiven retrograd markierten Neuronen im JNC mit 15% deutlich geringer als in den DRGs der vorliegenden Arbeit. Von diesem Ergebnis abweichende Ergebnisse erhielten Plato et al. (2005). Sie verglichen erstmals direkt zwischen vagalen und spinalen pulmonalen Afferenzen der Ratte durch retrogrades Tracing mit Blick auf die Somagröße und u. a. auf Immunreaktivität für CGRP. CGRP-positive retrograd markierte Neurone kamen bei ihnen in den DRGs in einer Häufigkeit von 60% und in den JNCs sogar in einer Häufigkeit von 68% vor. Auch Springall et al. (1987) beschrieben ungefähr die Hälfte der retrograd markierten DRG-Neurone als CGRP-positiv. 50% der retrograd markierten DRG-Neurone der vorliegenden Arbeit ließen sich CGRP-positiven C-Fasern zuordnen.

In Bezug auf spinale Afferenzen stimmen daher alle vorliegenden Arbeiten überein, dass CGRP-positive und damit wahrscheinlich nozizeptive Neurone den größten Anteil der Atemwegs-/Lungenafferenzen stellen. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass eine Untergruppe dieser Neurone eine nAChR-Untereinheit exprimiert. Der bereits bekannte Effekt einer CGRP-Freisetzung in den Atemwegen als Antwort auf Nikotinapplikation (Jinno et al., 1994) ist daher durch direkte Stimulierung der sensorischen Endigung zu erklären.

5.5 Schlussfolgerung

Die vorliegende Arbeit zeigt erstmals die Expression einer definierten nAChR-Untereinheit ($\alpha 3$) von spinalen Atemwegs-/Lungenafferenzen. Mit 33% ist der Anteil dieser $\alpha 3$ -positiven Neurone an der Gesamtheit der retrograd markierten DRG-Neurone relativ groß. Alle $\alpha 3$ -positiven Neurone wiesen ebenfalls Immunreaktivität für CGRP auf. Unter den CGRP-positiven C-Fasern (durch Perikaryondurchmesser und fehlende NF68-Immunreaktivität definiert) machten sie 50% aus. Auf ihnen war mit 78% der größte Anteil der nAChRs lokalisiert. Die übrigen $\alpha 3$ -positiven Neurone waren in der Gruppe der CGRP/NF68-positiven Neuronen mit größerem Perikaryondurchmesser zu finden. Es ist daraus zu schließen, dass zumindest zwei Populationen spinaler Atemwegs-/Lungenafferenzen cholinerg über nAChR mit der $\alpha 3$ -Untereinheit stimuliert werden können. Gemeinsam sind diesen Populationen der CGRP-Gehalt und die angenommene nozizeptive Funktion. Sensorische Endigungen mit solcher Funktion sind insbesondere in und unmittelbar unter dem Epithel zu finden, welches selber eine Quelle von Acetylcholin darstellt (Kummer et al. 2008). Es ist daher anzunehmen, dass epitheliale Stimulation oder Schädigung mit folgender Acetylcholinfreisetzung der natürliche Initiator der cholinergen Stimulation CGRP-haltiger sensorischer Endigungen mit nachfolgender CGRP-Freisetzung (Jinno et al., 1994) und damit der lokalen Einleitung einer inflammatorischen Reaktion ist.

6 Zusammenfassung

Neben neuronalem ACh wird in den Atemwegen auch auto- und parakrin wirkendes non-neuronales ACh von verschiedenen Epithelzellen und Immunzellen synthetisiert und freigesetzt. Einerseits beteiligt es sich an entzündlichen Veränderungen der Atemwege, andererseits zeigt es antiinflammatorische Effekte. Dennoch sind die Zielstrukturen des epithelialen ACh noch nicht eindeutig identifiziert. Es ist plausibel anzunehmen, dass epitheliales ACh vorzugsweise an Strukturen wirkt, die in enger Nachbarschaft zum Epithel liegen. Neben Zellen des Immunsystems sind insbesondere sensorische Nervenendigungen als Wirkungsort des epithelialen ACh denkbar.

Die vorliegende Arbeit zeigt erstmals die Expression einer definierten nAChR-Untereinheit ($\alpha 3$) von spinalen Atemwegs-/Lungenafferenzen.

Dafür wurden transgene Mäuse verwendet, in denen das grün fluoreszierende Protein eGFP unter der Kontrolle der endogenen $\alpha 3$ -nAChR-Untereinheit Promotoraktivität exprimiert wird. Mittels retrogradem Tracing mit dem Tracerfarbstoff Fast Blue, der in die Atemwege bzw. das Lungenparenchym appliziert wurde, konnten zur Lunge bzw. zu den Atemwegen projizierende DRG-Neurone markiert und somit spinale Atemwegsafferenzen lokalisiert werden. Um Aussagen über die Qualität dieser Nervenfasern zu treffen, wurden die retrograd markierten DRG-Neurone auf die Expression des $\alpha 3$ -eGFP sowie auf ihre Immunreaktivität gegenüber CGRP (einem Neuropeptid) und NF68 (einem Marker für myelinisierte Nervenfasern) untersucht. Ebenfalls wurde ihre Somagröße bestimmt.

Die Auswertung zeigte, dass 33% der retrograd markierten DRG-Neurone, die die Atemwege und Lunge innervieren, die nAChR-Untereinheit $\alpha 3$ exprimieren. Die $\alpha 3$ -Untereinheit kam nur in DRG-Neuronen vor, die sich ebenfalls CGRP-positiv zeigten. Am häufigsten war eine FB/ $\alpha 3$ /CGRP-positive Subpopulation, es konnte aber auch eine FB/ $\alpha 3$ /CGRP/NF68-positive Subpopulation nachgewiesen werden. Die DRGs T1 und T2 zeigten den größten Anteil an retrograd markierten Neuronen. Die Mehrheit der retrograd markierten Neurone besaß eine Größe zwischen 15-25 μm . Die retrograd markierten DRG-Neurone, die Immunreaktivität für NF68 aufwiesen, besaßen im Durchschnitt einen großen Perikaryondurchmesser. $\alpha 3$ -positive DRG-Neurone hingegen hatten einen kleineren Perikaryondurchmesser, während solche, die sich immunreaktiv für CGRP zeigten sowohl kleine als auch große Perikaryondurchmesser aufwiesen.

Die vorliegende Arbeit weist damit erstmals die α_3 -Untereinheit des nAChR auf sensorischen Neuronen der unteren Atemwege nach. Die Mehrheit der zur Lunge projizierenden DRG-Neurone konnte den A δ - und C-Fasern zugeordnet werden. Im Vergleich mit vagalen Atemwegs-/Lungenafferenzen zeigten sich in der relativen Häufigkeit funktionell definierter Neuronpopulationen Unterschiede. Eine über die α_3 -Untereinheit vermittelte Erregung sensorischer Fasern spielt vornehmlich bei spinalen Afferenzen eine Rolle und betrifft sowohl eine nicht-myelinisierte (C-Fasern) als auch eine myelinisierte (A δ -Fasern) Population. Zumindest zwei Populationen spinaler Atemwegs-/Lungenafferenzen können cholinerg über nAChR mit der α_3 -Untereinheit stimuliert werden. Gemeinsam sind diesen Populationen der CGRP-Gehalt und die angenommene nozizeptive Funktion. Sensorische Endigungen mit solcher Funktion sind insbesondere in und unmittelbar unter dem Epithel zu finden, welches selber eine Quelle von ACh darstellt. Es ist daher anzunehmen, dass epitheliale Stimulation oder Schädigung mit folgender ACh-Freisetzung der natürliche Initiator der cholinergen Stimulation CGRP-haltiger sensorischer Endigungen mit nachfolgender CGRP-Freisetzung und damit der lokalen Einleitung einer inflammatorischen Reaktion ist.

7 Literaturverzeichnis

Adams PR. (1975): An analysis of the dose-response curve at voltage-clamped frog-endplates. *Pflugers Arch. Oct* 28;360(2):145-53.

Adriaensen D, Brouns I, Van Genechten J, Timmermans JP. (2003): Functional morphology of pulmonary neuroepithelial bodies: extremely complex airway receptors. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2003 Jan;270(1):25-40.

Ahluwalia J, Urban L, Bevan S, Capogna M, Nagy I. (2002): Cannabinoid 1 receptors are expressed by nerve growth factor- and glial cell-derived neurotrophic factor-responsive primary sensory neurones. *Neuroscience* 110: 747-53.

Amara, S.G., Arriza, J.L., et al. (1985): Expression in brain of messenger RNA encoding a novel neuropeptide homologous to calcitonin gene-related peptide. *Science*, 229,1094-1099.

Anand R., Conroy W.G., Schoepfer R., Whiting P., Lindstrom J. (1991): Neuronal nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus* oocytes have a pentameric quaternary structure. *J. Biol. Chem.* 266: 11192-11198.

Blottner, D., and H. G. Baumgarten. (1992): Nitric oxide synthetase (NOS)-containing sympathoadrenal cholinergic neurons of the rat IML-cell column: evidence from histochemistry, immunohistochemistry, and retrograde labeling. *J Comp Neurol* 316(1):45-55.

Bennett DL, Dmietrieva N, Priestley JV, Clary D, McMahon SB (1996): trkA, CGRP and IB4 expression in retrogradely labelled cutaneous and visceral primary sensory neurones in the rat. *Neurosci Lett* 206: 33-6.

Benninghoff, A.; Drenckhahn, D. (2008): *Anatomie 17. Auflage, Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie*, S.580.

Bernet N, Sanchez O, Dabert P, Olaizola A, Godon JJ, Delgenès JP. (2004): Effect of solid hold-up on nitrite accumulation in a biofilm reactor--molecular characterization of nitrifying communities. *Water Sci Technol.* 49(11-12):123-30.

- Blanchet MR, Israël-Assayag E, Cormier Y. (2004): Inhibitory effect of nicotine on experimental hypersensitivity pneumonitis in vivo and in vitro. *Am J Respir Crit Care Med*. 15;169(8):903-9.
- Boyd RT, Jacob MH, McEachern AE, Caron S, Berg DK. (1991): Nicotinic acetylcholine receptor mRNA in dorsal root ganglion neurons.
- Brouns I, Van Genechten J, Hayashi H, Gajda M, Gomi T, Burnstock G, Timmerman JP, Adriaensen D. (2003): Dual sensory innervation of pulmonary neuroepithelial bodies. *Am Respir Cell Mol Biol* 28:275–285.
- Cadieux A, Springall DR, Mulderry PK, Rodrigo J, Ghatei MA, Terenghi G, Bloom SR, Polak JM. (1986): Occurrence, distribution and ontogeny of CGRP immunoreactivity in the rat lower respiratory tract: effect of capsaicin treatment and surgical denervations. *Neuroscience*. 1986 Oct;19(2):605-27.
- Ching G. Y. and Liem R. K. (1993): Assembly of type IV neuronal intermediate filaments in nonneuronal cells in the absence in preexisting cytoplasmic intermediate filaments, *122:1323-35*.
- Chopra B, Giblett S, Little JG, Donaldson LF, Tate S, Evans RJ, Grubb BD (2000): Cyclooxygenase-1 is a marker for a subpopulation of putative nociceptive neurons in rat dorsal root ganglia. *Eur J Neurosci* 12: 911-20.
- Canning BJ, Fischer A, Udem BJ. (1998): Pharmacological analysis of the tachykinin receptors that mediate activation of nonadrenergic, noncholinergic relaxant nerves that innervate guinea pig trachealis. *J Pharmacol Exp Ther*. 284(1):370-7.
- Canning B.J. (2006): Anatomy and Neurophysiology of the Cough Reflex. *Chest*;129;33S-47S
- Carucci J.A., Ignatius R., Wei Y., Cypes A.M., Schaer D.A., Pope M., Steinman R.M. and Mojsov S. (2000): Calcitonin Gene-Related Peptide Decreases Expression of HLA-DR and CD86 by Human Dendritic Cells and Dampens Dendritic Cell-Driven T Cell-Proliferative Responses Via the Type I Calcitonin Gene-Related Peptide Receptor. *The Journal of Immunology*, 2000, 164: 3494-3499.
- Coburn, R. F., and T. Tomita. (1973): Evidence for nonadrenergic inhibitory nerves in the guinea pig trachealis muscle. *Am J Physiol* 224(5):1072-80.

Coleridge, J. C., and H. M. Coleridge. (1984): Afferent vagal C fibre innervation of the lungs and airways and its functional significance. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 99:1-110.

Coleridge H.M. and Coleridge J.C. (1994): Pulmonary reflexes: Neural mechanism of pulmonary defense. *Annual Review of Physiology*; 56: 69-91.

Copray JC, Mantingh I, Brouwer N, Biber K, Kust BM, Liem RS, Huitinga I, Tilders FJ, Van Dam AM, Boddeke HW (2001): Expression of interleukin-1 beta in rat dorsal root ganglia. *J Neuroimmunol* 118: 203-11.

P. J. Corringer, N. N. Le und J. P. Changeux (2000): Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.*, 40:431–458.

Couturier J., Erkman C., Valera S., Rungger D., Bertrand S., Boulter J., Ballivet M., Bertrand D. (1990): $\alpha 3$, $\alpha 5$ and non- $\alpha 3$: three clustered avian genes encoding neuronal acetylcholine receptor-related subunits. *J. Biol. Chem.* 265: 17560-17567

F. A. Dajas-Bailador, A. J. Mogg und S. Wonnacott (2002): Intracellular Ca^{2+} signals evoked by stimulation of nicotinic acetylcholine receptors in SH-SY5Y cells: contribution of voltage-operated Ca^{2+} channels and Ca^{2+} stores. *J.Neurochem.*, 81(3):606–614.

Dani JA, Heinemann S. (1996): Molecular and cellular aspects of nicotine abuse. *Neuron*. 16(5):905-8.

Dehkordi O, Kc P, Balan K, Haxhiu M. (2006): Airway-related vagal preganglionic neurons express multiple nicotinic acetylcholine receptorsubunits. *Auton Neurosci* 128:53–63.

Dehkordi O, Millis RM, Dennis GC, Jazini E, Williams C, Hussain D, Jayam-Trouth A. (2007): Expression of alpha-7 and alpha-4 nicotinic acetylcholine receptors by GABAergic neurons of rostral ventral medulla and caudal pons. *Brain Res* 1185:95–102.

Dehkordi O., Rose J., Balan K., Prabha K., Millis R., Jayam-Trouth A. (2009): Neuroanatomical Relationships of Substance P-Immunoreactive Intrapulmonary C-Fibers and Nicotinic Cholinergic Receptors. *Journal of Neuroscience Research* 87:1670–1678

Deneris E.S., Conolly J., Rogers S.W., Duvoisin R. (1991): Pharmacological and functional diversity of the neuronal acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 12: 34-40.

Dey, R.D., Altemus, J.B., Zervos, I., Hoffpauir, J., 1990. Origin and colocalization of CGRP- and SP-reactive nerves in cat airway epithelium. *J. Appl. Physiol.* 68 (2): 770-8

Dinh, Q.T., (2001): Die sensible und sympathische Innervation der unteren Atemwege der Maus.

Dinh QT, Groneberg DA, Peiser C, Mingomataj E, Joachim RA, Witt C, Arck PC, Klapp BF, Fischer A. (2004): Substance P expression in TRPV1 and trkA-positive dorsal root ganglion neurons innervating the mouse lung. *Respir Physiol Neurobiol.* 2004 Nov 30;144(1):15-24.

Dinh, Q.T., Groneberg, D.A., Peiser, C., Joachim, R.A., Frossard, N., Arck, P.C., Klapp, B.F., Fischer, A., 2005. Expression of substance P and nitric oxide synthase in vagal sensory neurons innervating the mouse airways. *Regul. Pept.* 126 (3): 189-194

Doidge, J. M., and D. G. Satchall. (1982): Adrenergic and non-adrenergic inhibitory nerves in mammalian airways. *J Auton Nerv Syst* 5(2):83-99.

Drenckhahn, D.. (1994). Zytoskelett, Zilien, Zentriolen. In „Benninghoff Anatomie, 15. Auflage“, pp. 33-45. Urban & Schwarzenberg München-Wien-Baltimore.

Dussor GO, Jones DJ, Hulsebosch CE, Edell TA, Flores CM. (2005): The effects of chemical or surgical deafferentation on [3H]-acetylcholine release from rat spinal cord. *Neuroscience*.135(4):1269-76. Epub 2005 Sep 13.

Duvoisin R.M., Deneris E.S., Patrick J., Heinemann S. (1989): The functional diversity of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor is increased by a novel subunit. *α4. Neuron* 3: 487-496

S. J. Edelstein und J. P. Changeux (1998): Allosteric transitions of the acetylcholine receptor. *Adv. Protein Chem.*, 51:121–184.

Elgoyhen A.B, Douglas E. Vetter, Eleonora Katz, Carla V. Rothlin, Stephen F. Heinemann, and Jim Boulter (2001): $\alpha 10$: A determinant of nicotinic cholinergic receptor function in mammalian vestibular and cochlear mechanosensory hair cells. *Proc Natl Acad Sci* 98(6): 3501–3506.

Fischer A., Hoffmann B. (1996): Nitric oxide synthase in neurons and nerve fibers of lower airways and in vagal sensory ganglia of man. Correlation with neuropeptides. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, Vol 154, No. 1, Jul 1996, 209-216.

Fischer A. (1997): Die Nervenversorgung der Atemwege: Einflüsse der allergischen Entzündungsreaktion. *Allergologie* 20: 115-120.

Fischer A., Canning B. J., Udem B. J., Kummer W. (1998): Evidence for an esophageal origin of VIP-IR and NO synthase-IR nerves innervating the guinea pig trachealis: A retrograde neuronal tracing and immunohistochemical analysis. *J. Comp. Neurol.* 394:326-334.

Fu XW, Nurse CA, Farragher SM, Cutz E. (2003): Expression of functional nicotinic acetylcholine receptors in neuroepithelial bodies of neonatal hamster lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285:1203–1212.

Galzi J.L., Changeux J.P. (1995): Neuronal nicotinic receptors: molecular organisation and regulations. *Neuropharmacology* 34 : 563-582

Gasser, H.S.. (1945): Mammalian nerve fibrers. Nobel lecture, December 12, 1945. In “Nobel Lectures, Physiology or Medicine 1942-1962”, pp. 34-47. *Elsevier Publishing Company Amsterdam, 1964.*

Genzen JR, Van Cleve W, McGehee DS. (2001): Dorsal root ganglion neurons express multiple nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *J Neurophysiol* 86:1773–1782.

Gerzanich V., Anand R., Lindstrom J. (1994): Homomers of $\alpha 8$ and $\alpha 7$ subunits of nicotinic receptors exhibit similar channel but contrasting binding site properties. *Mol. Pharmacol.* 45:212-220

Gibson, S.J., Polak, J.M., et al. (1984): Calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunoreactivity in the spinal cord of man, and eight other species. *J Neurosci*, 43, 1101-1111.

Gottschall J, Neuhuber W, Müntener M, Mysicka A. (1980): The ansa cervicalis and the infrahyoid muscles of the rat. II. Motor and sensory neurons. *Anat Embryol (Berl)*. 1980;159(1):59-69.

Groth M, Helbig T, Grau V, Kummer W, Haberberger RV. (2006): Spinal afferent neurons projecting to the rat lung and pleura express acid sensitive channels. *Respir Res. Jul 1*;7:96.

Gu Q, Ni D, Lee LY. (2008): Expression of neuronal nicotinic acetylcholine receptors in rat vagal pulmonary sensory neurons. *Respir Physiol Neurobiol* 161:87–91.

Gueorguiev VD, Zeman RJ, Hiremagalur B, Menezes A, Sabban EL. (1999): Differing temporal roles of Ca²⁺ and cAMP in nicotine-elicited elevation of tyrosine hydroxylase mRNA. *Am J Physiol.* Jan;276(1 Pt 1):C54-65.

Guz A. and Treuchard D.W. (1971): Pulmonary stretch receptor activity in man: A comparison with dog and cat. *J. Physiol. (Lond)*; 213: 329-343.

Haberberger RV, Bernardini N, Kress M, Hartmann P, Lips KS, Kummer W. (2004): Nicotinic acetylcholine receptor subtypes in nociceptive dorsal root ganglion neurons of the adult rat. *Auton Neurosci.* 113(1-2):32-42.

Heinemann S., Boulter J., Connolly J., Goldman D., Evans K., Treco D., Ballivet M., Patrick J. (1986): Structure and function of the nicotinic acetylcholine receptor. NATO ASI Series H: *Cell biology*, vol 3: 359-387 Springer Verlag Berlin

Henningfield JE, Miyasato K, Jasinski DR. (1985): Abuse liability and pharmacodynamic characteristics of intravenous and inhaled nicotine. *J Pharmacol Exp Ther.* 1985 Jul;234(1):1-12

Hermann H., Aebi U., (2000): Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. *Curr Opin Cell Biol*, 12(1): 79-90.

Hersch M. I., Satchell P. M, Sullivan C. E. and McLeod J. G. (1986): Abnormal pulmonary slowly adapting receptors in canine acrylamide neuropathy. *J Appl Physiol* 60: 376-384.

Hisanaga S., Ikai A., Hirokawa N., (1990): Molecular architecture of the neurofilament. I. Subunit arrangement of neurofilament L protein in the intermediate-sized filament. *J Mol Biol*, 211(4): 857-69.

Hoffmann P. N. and Lasek R. J. (1975): The slow component of axonal transport. Identification of major structural polypeptides of the axon and their generality among mammalian neurons. *J Cell Biol*, 66:351-66.

Hollenberg MD. (1986): Mechanisms of receptor-mediated transmembrane signalling. *Experientia*;42:718-27. Review.

Hong JL, Rodger IW, Lee LY. (1995): Cigarette smoke-induced bronchoconstriction: cholinergic mechanisms, tachykinins, and cyclooxygenase products. *J Appl Physiol* 78:2260–2266.

Hsiue TR, Garland A, Ray DW, Hershenson MB, Leff AR, Solway J. (1992): Endogenous sensory neuropeptide release enhances nonspecific airway responsiveness in guinea pigs. *Am Rev Respir Dis.* 146(1):148-53.

Hucho F. (1986): The nicotinic receptor and its ion channel. *Eur. J. Biochem.* 158: 211-226

Hu-Tsai M, Woolf C, Winter J (1996): Influence of inflammation or disconnection from peripheral target tissue on the capsaicin sensitivity of rat dorsal root ganglion sensory neurones. *Neurosci Lett* 203: 119-22.

Ishikawa H., Bischoff R., Holtzer H., (1968): Mitosis and intermediate-sized filaments in developing skeletal muscle. *J Cell Biol*, 38(3): 538-55.

Jinno S, Hua XY, Yaksh TL (1994): Nicotine and acetylcholine induce release of calcitonin gene-related peptide from rat trachea. *J Appl Physiol* 76:1651–1656

Julius D, Basbaum AI. (2001): Molecular mechanisms of nociception. *Nature.* 2001 Sep 13;413(6852):203-10.

Kao PN, Dwork AJ, Kaldany RR, Silver ML, Wideman J, Stein S, Karlin A. (1984): Identification of the alpha subunit half-cystine specifically labeled by an affinity reagent for the acetylcholine receptor binding site. *J Biol Chem.* 259(19):11662-5.

Kashiba H, Uchida Y, Senba E (2001): Difference in binding by isolectin B4 to trkA and c-ret mRNA-expressing neurons in rat sensory ganglia. *Brain Res Mol Brain Res* 95: 18-26.

Klapproth H, Racké K, Wessler I. (1998): Acetylcholine and nicotine stimulate the release of granulocyte-macrophage colony stimulating factor from cultured human bronchial epithelial cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 357(4):472-5.

Klinke, R. (2001): Bauelemente des Nervensystems. In “Klinke, Silbernagl: Lehrbuch der Physiologie, 3., vollständig überarbeitete Auflage“, pp. 539-552. *Georg Thieme Verlag Stuttgart – New York.*

Kollarik, M., Dinh, Q.T., Fischer, A., Udem, BJ., 2003. Capsaicin-sensitive and -insensitive vagal bronchopulmonary C-fibres in the mouse. *J. Physiol.* 551 (Pt 3): 869-79

Koltzenburg M, Torebjörk HE. (1995): Pain and hyperalgesia in acute inflammatory and chronic neuropathic conditions. *Lancet*. 1995 Apr 29;345(8957):1111

Koltzenburg M. (1999): The changing sensitivity in the life of the nociceptor. *Pain*. 1999 Aug;Suppl 6:S93-102.

Kress M, Zeilhofer HU. (1999): Capsaicin, protons and heat: new excitement about nociceptors. *Trends Pharmacol Sci*. 1999 Mar;20(3):112-8.

Kummer W, Fischer A, Preissler U, Couraud JY, Heym C. (1990): Immunohistochemistry of the guinea-pig trachea using an anti-idiotypic antibody recognizing substance P receptors. *Histochemistry*. 1990;93(5):541-6.

Kummer W., Fischer A., Kurkowski R., and Heym C. (1992): The sensory and sympathetic innervation of guinea-pig lung and trachea as studied by retrograde neuronal tracing and double-labelling immunohistochemistry. *Neuroscience* 49(3):715-37.

Kummer W., Oberst P. (1993): Neuronal projections to the guinea pig stellate ganglion investigated by retrograde tracing. *J. Auton. Nerv. Syst.* 42: 71-80.

Kummer W, Lips KS, Pfeil U. (2008): The epithelial cholinergic system of the airways. *Histochem Cell Biol* 130(2):219-234.

König, Liebich (2002)

Kwong K, Wu ZX, Kashon ML, Krajnak KM, Wise PM, Lee LY. (2001): Chronic smoking enhances tachykinin synthesis and airway responsiveness in guinea pigs. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001 Sep;25(3):299-305.

Lawson SN, Waddell PJ. (1991): Soma neurofilament immunoreactivity is related to cell size and fibre conduction velocity in rat primary sensory neurons. *J Physiol*. 1991 Apr;435:41-63.

Lawson, S.N.. (2002):Phenotype and function of somatic primary afferent nociceptive neurones with C-,Aδ- or Aα/β-fibres. *Exp Physiol* 87(2): 239-244.

Lee, L.Y., Kou, Y.R., Frazier, D.T., Beck, E.R., Pisarri, T.E., Coleridge, H.M., Coleridge, J.C., (1989): Stimulation of vagal pulmonary c-fibers by a single breath of cigarette smoke in dogs. *J. Appl. Physiol*. 66 (5): 2032-8

Lee, L.Y., Gerhardstein, D.C., Wang, A.L., Burki, N.K., (1993): Nicotine is responsible for airway irritation evoked by cigarette smoke inhalation in men. *J. Appl. Physiol.* 75 (5): 1955-61

Lee LY, Pisarri TE. (2001): Afferent properties and reflex functions of bronchopulmonary C-fibers. *Respir Physiol.* 125(1-2):47-65.

Lee LY, Burki NK, Gerhardstein DC, Gu Q, Kou YR, Xu J. (2007): Airway irritation and cough evoked by inhaled cigarette smoke: role of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Pulm Pharmacol Ther* 20:355–364

Lee LY, Gu Q. (2009): Cough sensors. IV. Nicotinic membrane receptors on cough sensors. *Handb Exp Pharmacol.* 187:77-98.

Lendahl U., Zimmermann L.B., McKay R.D., (1990): CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*, 60(4): 585-95.

LeNovere N., P. J. Corringer und J. P. Changeux (2002): The diversity of subunit composition in nAChRs: evolutionary origins, physiologic and pharmacologic consequences. *J. Neurobiol.*, 53(4):447–456.

Leonhard H. (1990): Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen. 8. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, S.277-306

Leonard S, Bertrand D. (2001): Neuronal nicotinic receptors: from structure to function. *Nicotine Tob Res.* 3(3):203-23.

Lester HA, Changeux JP, Sheridan RE. (1975): Conductance increases produced by bath application of cholinergic agonists to Electrophorus electroplaques. *J Gen Physiol.* 65(6):797-816.

Lester HA, Koblin DD, Sheridan RE. (1978): Role of voltage-sensitive receptors in nicotinic transmission. *Biophys J., Mar*;21(3):181-94.

Levine, J.D., Fields, H.L., et al. (1993): Peptides and an the primary afferent nociceptor. *J Neurosci*,13(6), 2273-2286.

Lewis S. A., Cowan N.J., (1985): Genetics, evolution, and expression of the 68,000-mol-wt neurofilament protein: isolation of a cloned cDNA probe. *J Cell Biol*, 100(3): 843-50.

Li L, Zhou XF (2001): Pericellular Griffonia simplicifolia I isolectin B4-binding ring structures in the dorsal root ganglia following peripheral nerve injury in rats. *J Comp Neurol* 439: 259-74.

Lind RJ, Hardick DJ, Blagbrough IS, Potter BV, Wolstenholme AJ, Davies AR, Clough MS, Earley FG, Reynolds SE, Wonnacott S. (2001): [3H]-Methyllycaconitine: a high affinity radioligand that labels invertebrate nicotinic acetylcholine receptors. *Insect Biochem Mol Biol.* Apr 27;31(6-7):533-42.

Lindh, B., W. Staines, T. Hokfelt, L. Terenius, and P. M. Salvaterra. (1986): Immunohistochemical demonstration of choline acetyltransferase-immunoreactive preganglionic nerve fibers in guinea pig autonomic ganglia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(14):5316-20.

Lindstrom J.; A. North (Hrsg.) (1995): Nicotinic acetylcholine receptors. *Handbook of Receptors*, S. 153–175. CRC Press.

Lindstrom J. (1996): Neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Ion Channels*, 4:377– 450.

Lindstrom J. (1997): Nicotinic acetylcholine receptors in Health and Disease. *Mol. Neurobiol.* 15(2): 193-222

Lu CR, Hwang SJ, Phend KD, Rustioni A, Valtschanoff JG (2003): Primary afferent terminals that express presynaptic NR1 in rats are mainly from myelinated, mechanosensitive fibers. *J Comp Neurol* 460: 191-202.

R. J. Lukas, J. P. Changeux, N. N. Le, E. X. Albuquerque, D. J. Balfour, D. K. Berg, D. Bertrand, V. A. Chiappinelli, P. B. Clarke, A. C. Collins, J. A. Dani, S. R. Grady, K. J. Kellar, J. M. Lindstrom, M. J. Marks, M. Quik, P. W. Taylor und S. Wonnacott (1999): International Union of Pharmacology. XX. Current status of the nomenclature for nicotinic acetylcholine receptors and their subunits. *Pharmacol.Rev.*, 51(2):397–401.

Maggi C.A., A. Giachetti, R.D. Dey, and S. I. Said. (1995): Neuropeptides as regulators of airway function: vasoactive intestinal Peptide and the tachykinins. *Physiol Review* 75:277-322.

Mann, S. P. (1971): The innervation of mammalian bronchial smooth muscle: the localization of catecholamines and cholinesterases. *Histochem J* 3(5):319-311.

Mao D, Yasuda RP, Fan H, Wolfe BB, Kellar KJ. (2006): Heterogeneity of nicotinic cholinergic receptors in rat superior cervical and nodose ganglia. *Mol Pharmacol* 70:1693–1699.

Maus AD, Pereira EF, Karachunski PI, Horton RM, Navaneetham D, Macklin K, Cortes WS, Albuquerque EX, Conti-Fine BM. (1998): Human and rodent bronchial epithelial cells express functional nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol*. 54(5):779-88.

Martling, C. R., A. Saria, J. A. Fischer, T. Hokfelt, and J. M. Lundberg. (1988): Calcitonin gene-related peptide and the lung: neuronal coexistence with substance P, release by capsaicin and vasodilatory effect. *Regul Pept* 20(2):125-39.

McMahon SB, Bennett, D. L. H. (1999): Trophic factors and pain. Textbook of pain. Patrick D. Wall RM. Edinburgh, *Churchill Livingstone*: 105-128.

Michael GJ, Priestley JV (1999): Differential expression of the mRNA for the vanilloid receptor subtype 1 in cells of the adult rat dorsal root and nodose ganglia and its downregulation by axotomy. *J Neurosci* 19: 1844-54.

N. S. Millar (2003).: Assembly and subunit diversity of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem.Soc.Trans.*, 31(Pt 4):869–874.

Molliver DC, Wright DE, Leitner ML, Parsadanian AS, Doster K, Wen D, Yan Q, Snider WD. (1997): IB4-binding DRG neurons switch from NGF to GDNF dependence in early postnatal life. *Neuron*. 1997 Oct;19(4):849-61.

Monteiro, M. J. and Cleveland, D. W. (1989): Expression of NF-L and NF-M in fibroblasts reveals coassembly of neurofilament and vimentin subunits. *J Cell Biol*. 108, 579-93

Mulle C., Lena C., Changeux J.P. (1992): Potentiation of nicotinic receptor response by external calcium in rat central neurons. *Neuron* 8:937-945

Myers, A.C., Kajekar, R., Undem, B.J., 2002. Allergic inflammation-induced neuropeptide production in rapidly adapting afferent nerves in guinea pig airways. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol*. 282 (4): L775-81

Nadel J. (1990): Neutral endopeptidase modulation of neurogenic inflammation in airways. *Eur Respir J Suppl.*, 12:645s-651s.

Neher E., Steinbach J.M. (1978): Local anaesthetics transiently blocks currents through single acetylcholine channels. *J. Physiol.* 277: 153-176

Nickel, Schummer, Seiferle, Lehrbuch der Anatomie der Haustiere Band 4, 3. Auflage, Paul Parey Verlag 1992.

Noguchi K, Senba E, Morita Y, Sato M, Tohyama M. (1990). Co-expression of alpha-CGRP and beta-CGRP mRNAs in the rat dorsal root ganglion cells. *Neurosci Lett.* 1;108(1-2):1-5.

Ogun-Muyiwa P, Helliwell R, McIntyre P, Winter J (1999): Glial cell line derived neurotrophic factor (GDNF) regulates VR1 and substance P in cultured sensory neurons. *Neuroreport* 10: 2107-11.

Ohara O., Gahara Y., Miyake T., Teraoka H. and Kitamura T. (1993): Neurofilament deficiency in quail caused by nonsense mutation in neurofilament-L gene. *J Cell Biol*, 121:387-95.

Ohtori S, Takahashi K, Chiba T, Yamagata M, Sameda H, Moriya H (2001): Brain-derived neurotrophic factor and vanilloid receptor subtype 1 immunoreactive sensory DRG neurons innervating the lumbar facet joints in rats. *Auton Neurosci* 94: 132-5.

Okabe S., Miyasaka H., Hirokawa N., (1993): Dynamics of the neuronal intermediate filaments. *J Cell Biol*, 121(2): 375-86.

Pereira EF, Reinhardt-Maelicke S, Schrattenholz A, Maelicke A, Albuquerque EX. (1993): Identification and functional characterization of a new agonist site on nicotinic acetylcholine receptors of cultured hippocampal neurons. *J Pharmacol Exp Ther.* 265(3):1474-91.

Parry, D. A. D., and P. M. Steinert. (1995): *Intermediate filament structure*, Springer-Verlag, Berlin.

Partanen, M., A. Laitinen, A. Hervonen, M. Toivanen, and L. A. Laitinen (1982): Catecholamine- and acetylcholinesterase-containing nerves in human lower respiratory tract. *Histochemistry* 76(2):175-88.

Perkins KA, Gerlach D, Broge M, Sanders M, Grobe J, Fonte C, Cherry C, Wilson A, Jacob R. (2001): Quitting cigarette smoking produces minimal loss of chronic tolerance to nicotine. *Psychopharmacology* 158:7-17.

Petruska JC, Napaporn J, Johnson RD, Gu JG, Cooper BY (2000): Subclassified acutely dissociated cells of rat DRG: histochemistry and patterns of capsaicin-, proton-, and ATP-activated currents. *J Neurophysiol* 84: 2365-79.

Petruska JC, Napaporn J, Johnson RD, Cooper BY (2002): Chemical responsiveness and histochemical phenotype of electrophysiologically classified cells of the adult rat dorsal root ganglion. *Neuroscience* 115: 15-30.

Plato M, Kummer W, Haberberger RV. (2005): Structural and neurochemical comparison of vagal and spinal afferent neurons projecting to the rat lung. *Neurosci Lett*. 2006 Mar 13;395(3):215-9. Epub 2005 Nov 23.

Quick M. (1987): Evidence for an involvement of membrane lipids in the control of neuronal nicotinic receptor function using bungarotoxin II-S1. *J. Neurochem.* 48: 1761-1767

Rathouz MM, Berg DK. (1994): Synaptic-type acetylcholine receptors raise intracellular calcium levels in neurons by two mechanisms. *J Neurosci.* 14(11 Pt 2):6935-45.

Reeh PW, Steen KH. (1996): Tissue acidosis in nociception and pain. *Prog Brain Res.* 1996;113:143-51.

Ricco, M. M., W. Kummer, B. Biglari, A. C. Myers, and B. J. Undem. (1996): Interganglionic segregation of distinct vagal afferent fibre phenotypes in guinea-pig airways. *J Physiol (Lond)* 496(Pt 2):521-30.

Rieger, C.; Hardt, H. v.d.; Sennhauser, F.H.; Wahn, U.; Zach, M. (2004): Pädiatrische Pneumologie, *Springer-Verlag GmbH*, 2. Aufl. S. 25

Sakaguchi T., Okada M., Kitamura T. and Kawasaki K.(1993): Reduced diameter and conduction velocity of myelinated fibers in the sciatic nerve of a neurofilament- deficient mutant quail. *Neurosci Lett*, 153:65-8.

Sant'Ambrogio G. and Widdicombe J.G. (2001): Reflexes from airway rapidly adapting receptors. *Respir. Physiol.*; 125(1-2): 33-45.

P. B. Sargent (1993): The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Annu. Rev.Neurosci.*, 16:403–443.

Reinheimer T, Baumgärtner D, Höhle KD, Racké K, Wessler I. (1997): Acetylcholine via muscarinic receptors inhibits histamine release from human isolated bronchi. *Am J Respir Crit Care Med.* 156(2 Pt 1):389-95.

Rose JE, Zinser MC, Tashkin DP, Newcomb R, Ertle A. (1984): Subjective response to cigarette smoking following airway anesthetization. *Addict Behav* 9:211–215.

Rose JE, Tashkin DP, Ertle A, Zinser MC, Lafer R. (1985): Sensory blockade of smoking satisfaction. *Pharmacol Biochem Behav* 23:289– 293.

Sant'Ambrogio G (1982): Information arising from the tracheobronchial tree of mammals. *Physiol Rev.* 1982 Apr;62(2):531-69.

Saria A., Martling C.R., Dalsgaard, C.J., Lundberg J.M. (1985): Evidence for substance P-immunoreactive spinal afferents that mediate bronchoconstriction. *Acta Physiol. Scand.* 125 :407-414.

Saria, A., C. R. Martling, Z Yan, E.Theodorsson-Norheim, R Gamse and J. M. Lundberg (1988): Release of multiple tachykinins from capsaicin-sensitive sensory nerves in the lung by bradykinin, histamine, dimethylphenyl piperazinium, and vagal nerve stimulation. *Am Rev Respir Dis* 137:1330-5.

Schliecker, K. (2009): Nachweis der nikotinischen Acetylcholin-Rezeptor α_3 -Untereinheit auf vagalen Atemwegsafferenzen.

Schlier, A. (2009): Einfluss von CGRP auf das Kontraktionsverhalten ventrikulärer Herzmuskelzellen, CGRP-alpha responsiveness of adult rat ventricular cardiomyocytes from normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Urn:nbn:hebis:26-opus-6840, Url: <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2009/6804/>.*

Schoepfer R., Conroy W.G., Whiting P., Gore M., Linstrom J. (1990): Brain α -bungarotoxin binding proteins cDNAs and mAbs reveal subtypes of this branch of ligand-gated ion channel superfamily. *Neuron* 5: 35-48

Schuller DE, Zampelli AR. (2003): Asthma medications. *J Asthma.*;40 Suppl:19-22. No abstract available.

Schultz HD, Davis B, Coleridge HM, Coleridge JC. (1991): Cigarette smoke in lungs evokes reflex increase in tracheal submucosal gland secretion in dogs. *J Appl Physiol* 71:900–909

Segond von Banchet G, Pastor A, Biskup C, Schlegel C, Benndorf K, Schaible HG (2002): Localization of functional calcitonin gene-related peptide binding sites in a subpopulation of cultured dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* 110: 131-45.

Seguela P., Wadiche J., Dinley-Miller K., Dani J.A., Patrick J. (1993): Molecular cloning, functional properties and distribution of rat brain $\alpha 7$: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *J. Neurosci.* 13: 596-604

Sekhon HS, Jia Y, Raab R, Kuryatov A, Pankow JF, Whitsett JA, Lindstrom J, Spindel ER. (1999): Prenatal nicotine increases pulmonary $\alpha 7$ nicotinic receptor expression and alters fetal lung development in monkeys. *J Clin Invest* 103:637–647.

Sheppard, M. N., Kurian, S. S., Henzen-Logmans, S. C., Michetti, F., Cocchia, D., Cole, P., Rush, R. A., Marangos, P. J., Bloom, S. R. und Polak, J. M., (1983): Neurone-specific enolase and S-100: new markers for delineating the innervation of the respiratory tract in man and other mammals. *Thorax.* 38, 333-340.

Silos-Santiago I, Molliver DC, Ozaki S, Smeyne RJ, Fagan AM, Barbacid M, Snider WD. (1995): Non-TrkA-expressing small DRG neurons are lost in TrkA deficient mice. *J Neurosci.* 1995 Sep;15(9):5929-42.

Silverman JD, Kruger L. (1990): Selective neuronal glycoconjugate expression in sensory and autonomic ganglia: relation of lectin reactivity to peptide and enzyme markers. *J Neurocytol.* 1990 Oct;19(5):789-801.

Simons CT, Sudo S, Sudo M, Carstens E. (2003): Mecamylamine reduces nicotine cross-desensitization of trigeminal caudalis neuronal responses to oral chemical irritation. *Brain Res.* 2003 Nov 21;991(1-2):249-53.

Smith R.V. and Satchell D.G. (1985): Extrinsic pathways of the adrenergic innervation of the guinea-pig trachealis muscle. *J. Auton. Nerv. Syst.*; 14; 61-73.

Snider WD, McMahon SB. (1998): Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors. *Neuron.* Apr;20(4):629-32.

Spies M, Lips KS, Kurzen H, Kummer W, Haberberger RV. (2006): Nicotinic acetylcholine receptors containing subunits $\alpha 3$ and $\alpha 5$ in rat nociceptive dorsal root ganglion neurons. *J Mol Neurosci.* 30(1-2):55-6.

Spindel E. R. (2003): Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: not just in brain. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 285(6):L1201-2.

Springall, D.R., Cadieux, A., Oliveira, H., Su, H., Royston, D., Polak, J.M., 1987. Retrograde tracing shows that CGRP-immunoreactive nerves of rat trachea and lung originate from vagal and dorsal root ganglia. *J. Auton. Nerv. Syst.* 20 (2): 155-66

Steenbergh, P.H., Hoppener, J.W.M., et al. (1984): Calcitonin gene-related peptide coding sequence is conserved in the human genome and is expressed in medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*, 59(2), 358-360.

Steenbergh P. H., Hoppener J. W. M., et al. (1985): A second human calcitonin/ CGRP gene. *FEBS Lett*, 183, 403-407.

Steen, K.H., Reeh, P.W., 1993. Actions of cholinergic agonists and antagonists on sensory nerve endings in rat skin, in vitro. *J. Neurophysiol.* 70 (1): 397-405

Storch A, Schrattenholz A, Cooper JC, Abdel Ghani EM, Gutbrod O, Weber KH, Reinhardt S, Lobron C, Hermesen B, Soskic V, et al. (1995): Physostigmine, galanthamine and codeine act as 'noncompetitive nicotinic receptor agonists' on clonal rat pheochromocytoma cells. *Eur J Pharmacol.* 290(3):207-19.

Stretton D. (1991): Non-adrenergic, non-cholinergic neural control of the airways. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 18(10):675-84.

Unger, J.W., Lange, W. (1991): Immunohistochemical mapping of neurophysins and calcitonin gene-related peptide in the human brainstem and cervical spinal cord. *J Chem Neuroanat*, 4, 299-309.

Stucky CL, Lewin GR (1999): Isolectin B(4)-positive and -negative nociceptors are functionally distinct. *J Neurosci* 19: 6497-505.

Talavera K, Gees M, Karashima Y, Meseguer VM, Vanoirbeek JA, Damann N, Everaerts W, Benoit M, Janssens A, Vennekens R, Viana F, Nemery B, Nilius B, Voets T. (2009): Nicotine activates the chemosensory cation channel TRPA1. *Nat Neurosci.* 2009 Oct;12(10):1293-9. *Epub* 2009 Sep 13.

M. Verbitsky, C. V. Rothlin, E. Katz und A. B. Elgoyhen (2000): Mixed nicotinic-muscarinic properties of the alpha9 nicotinic cholinergic receptor. *Neuropharmacology*, 39(13):2515–2524.

Van Rossum D, Hanisch UK, Quirion R. (1997): Neuroanatomical localization, pharmacological characterization and functions of CGRP, related peptides and their receptors. *Neurosci Biobehav Rev.* 21(5):649-78.

Vernino S., Rogers M., Ragcliffe A., Dani J.A. (1994): Quantitative measurement of calcium flux through muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J. Neurosci.* 14 (9): 5514-5524.

Wada E., Wada A., Boulter J., Deneris E., Heinemann S., Patrick J., Swanson L.W. (1989): Distribution of $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ and $\alpha 2$ neuronal nicotinic receptor subunit mRNAs in the central nervous system: a hybridization histochemical study in rat. *J. Comp. Neurol.* 284: 314-335.

Wang Y, Pereira EFR, Maus ADJ, Ostlie NS, Navaneetham D, Lei S, Albuquerque EX, Contine . (2001): Human bronchial epithelial and endothelial cells express $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* 60:1201–1209.

Wessler I, Kirkpatrick CJ, Racké K. (1998): Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems: expression and function in humans. *Pharmacol Ther.* 77(1):59-79.

Wessler IK, Kirkpatrick CJ. (2001): The Non-neuronal cholinergic system: an emerging drug target in the airways. *Pulm Pharmacol Ther.* 14(6):423-34.

Widdicombe J.G. and Wells U.M. (1994): Vagal reflexes. In: *Airway Smooth Muscle: Innervation and Neurotransmission*, ed. Raeburn D. and Giembycz M., pp.270-307. *Birkhauser Verlag Basel*

Widdicombe JG. (1998): Afferent receptors in the airways and cough. *Respir Physiol.* 1998 Oct;114(1):5-15.

Widdicombe J. (2001): Airway receptors. *Respir Physiol.* 125(1-2):3-15.

Wimalawansa, S.J., Moris, H.R., et al. (1990): Isolation, purification and characterisation of α -hCGRP from human spinal cord. *Biochem Biophys Res Commun*, 167, 993-1000.

Won MH, Park HS, Jeong YG, Park HJ (1998): Afferent innervation of the rat pancreas: retrograde tracing and immunohistochemistry in the dorsal root ganglia. *Pancreas* 16: 80-7.

Xu, W., Gelber, S., Orr-Urtreger, A., Armstrong, D., Lewis, R.A., Ou, C.N., Patrick, J., Role, L., De Biasi, M., Beaudet, A.L., 1999. Megacystis, mydriasis, and ion channel defect in mice lacking the alpha3 neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 96 (10): 5746-51

Xu J, Yang W, Zhang G, Gu Q, Lee LY. (2007): Calcium transient evoked by nicotine in isolated rat vagal pulmonary sensory neurons. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292:L54–L61.

Yan Y., Jensen K., Brown A. (2007): The polypeptide composition of moving and stationary neurofilaments in cultured sympathetic neurons. *Cell Motil Cytoskeleton*, 64:299-309.

Zhao J. X., Ohnishi A., Itakura C., Mizutani M., Yamamoto T., Hayashi H. and Murai Y. (1994): Greater number of microtubules per axon of unmyelinated fibers of mutant quails deficient in neurofilaments: possible compensation for the absence of neurofilaments. *Acta Neuropathol (Berl)*. 87:332-6.

Zhu Q., Lindenbaum M., Levavasseur F., Jacomy H. and Julien J. P. (1998): Disruption of the NF-H gene increases axonal microtubule content and velocity of neurofilament transport: Relief of axonopathy resulting from the toxin beta, beta'-iminodipropionitrile. *J Cell Biol*, 143_183-93,

Zschauer, AO. Sielczak, M.W., Smith, D.A., Wanner, A.. 1997. Norepinephrin-induced contraction of isolated rabbit bronchial artery: role of alpha1- and alpha2-adrenoceptor activation. *J. Appl. Physiol.* 82 (6): 1918-25

Summary

In the respiratory tract, acetylcholine (ACh) is synthesized and released both by neuronal and non-neuronal cells, acting in auto- and paracrine fashion. On the one hand, it parties involved in inflammatory reactions of the respiratory tract, on the other hand it also shows anti-inflammatory effects. Still, the cellular targets of non-neuronal ACh have not been unequivocally identified so far. It is plausible to suppose that epithelial ACh most likely acts upon structures in close vicinity to the epithelium. In addition to cells of the immune system, sensory nerve endings are likely targets of epithelial ACh.

This study is the first to show the expression of a defined nAChR-subunit ($\alpha 3$) by spinal respiratory/pulmonary afferents.

Transgenic mice were used in which the green fluorescent protein eGFP is expressed under the control of the endogenous $\alpha 3$ -nAChR-subunit promotor activity. DRG neurons projecting to the lung resp. respiratory tract were identified by retrograde neuronal tracing. To this end, the fluorescent tracer Fast Blue was applied into the airways and the lung parenchyma. To make statements about the quality of the airway/lung projecting neurons, the retrogradely labeled DRG-neurons were examined for their expression of $\alpha 3$ -eGFP as well as for their immunoreactivity to CGRP (a neuropeptide) and NF68 (a marker for myelinated nerve fibers). Also, their soma size was determined.

The evaluation shows that 33% of the retrogradely labeled DRG-neurons which innervate the respiratory tract and the lung express the nAChR-subunit $\alpha 3$. The $\alpha 3$ subunit exclusively appeared in DRG neurons that also were CGRP-positive. Most frequent was a FB/ $\alpha 3$ /CGRP-positive subpopulation; a FB/ $\alpha 3$ /CGRP/NF68-positive subpopulation, however, could also be noted. The DRGs T1 and T2 showed the biggest share of retrogradely labeled neurons. The majority of retrogradely labeled neurons were in a size range of 15-35 μ m. Those retrogradely labeled DRG-neurons that showed immunoreactivity for NF68 on average featured a large soma size. $\alpha 3$ -Subunit-positive DRG-neurons, however, featured a smaller soma size, while those that exhibited immunoreactivity to CGRP featured both, small and large soma size.

This study is the first to demonstrate the $\alpha 3$ -subunit of nAChR being expressed by sensory neurons innervating the lower respiratory tract. The majority of DRG neurons projecting to the lung could be classified as A δ - and C-fibers. Compared to vagal airway/lung afferents, differences became obvious concerning the relative frequency of functionally defined neuron

populations. A stimulation of sensory fibers transmitted by the $\alpha 3$ subunit mainly plays a role in spinal afferents and concerns both a non-myelinated (C-fiber) and a myelinated (A δ -fiber) population.

At least two populations of spinal airway/lung afferents may be cholinergically excited by nAChR with the $\alpha 3$ subunit. The commonness of these populations is their CGRP content and the assumed nociceptive function. Sensory endings with such functions can be found in and immediately below the epithelium, which itself is a source of ACh. Therefore, it can be assumed that epithelial stimulation or damage with the consequent of ACh release is a natural initiator of the cholinergic stimulation of CGRP containing sensory endings with consequent release of CGRP and thus of the local initiation of an inflammatory response.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich für die aktive und passive Unterstützung bei all denjenigen bedanken, die mir im Laufe der Erstellung dieser Arbeit zur Seite standen.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wolfgang Kummer für die hervorragende Betreuung, die durch viel Verständnis und offene Ohren gekennzeichnet war.

Frau Prof. Dr. Kölle danke ich für die Bereitschaft als erste Betreuerin zur Verfügung zu stehen.

Ich danke Kirstin Schliecker für die gute Zusammenarbeit und den Spaß an der Arbeit auch in schwierigen Situationen.

Den Mitarbeitern des Instituts für Anatomie und Zellbiologie, insbesondere Patricia Berger, Martin Bodenbenner, Tamara Papadakis, Silke Wiegand, Karola Michael, Petra Faulhammer und Claudia Tag, danke ich für das angenehme Arbeitsklima, die Geduld und die immer angebotene Hilfe.

Für ihr Verständnis und ihre Unterstützung danke ich meiner Familie, der ich immer blind vertrauen kann.

Meinem Freund Christoph danke ich dafür, dass er immer da ist wenn ich ihn brauche.

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Katja Hans



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5596-7



© Oleg Kozlov - Fotolia.com